



Dynamic Search: INPADOC/Family and Legal Status, JAPIO -Patent Abstracts of Japan, Derwent World Patents Index

Records for: PN=JP 6025288

save as alert...

save strategy only...

Output

Format: Long

Output as: Browser

display / send

Modify

refine search

back to picklist

select  
all none

Records 1-3 of 3 In long Format

□ 1. 4/34/1 (Item 1 from file: 351)

009797520

WPI ACC No: 1994-077373/ 199410

Novel peptide(s) with Transforming Growth Factor-beta activity - useful for treating wounds, osteoporosis, rheumatoid arthritis, etc.

Patent Assignee: KURARAY CO LTD (KURS )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

| Patent No  | Kind | Date     | Applicat No | Kind | Date     | week     |
|------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| JP 6025288 | A    | 19940201 | JP 92207501 | A    | 19920710 | 199410 B |

Priority Applications (No Type Date): JP 92207501 A 19920710

Patent Details:

| Patent No  | Kind | Lan | Pg | Main IPC    | Filing Notes |
|------------|------|-----|----|-------------|--------------|
| JP 6025288 | A    |     | 9  | C07K-007/08 |              |

Abstract (Basic): JP 6025288 A

The peptide or the salt of formula

H-X1-Ala-X2-Pro-Cys-Cys -Val-X3-Gln-X4 -Leu-Glu-X5-Y (I)

having TGF-beta activity is new.

In (I), X2 = Ser or Ala, X3 = Ser or Pro, X4 = Ala or Asp, X1, X5 = peptide fragment composed of 1-5 amino acid residue of Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Lys, Thr, His, Tyr, Nle or Ile, or a single bond and Y = OH or amino.

Also claimed is a peptide or salt of formula H-X6-A-X7-Y (II) having TGF-beta activity. In (II) A = the peptide fragment Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu, Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu, or Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu. X7 = the peptide fragment composed of 1-5 amino acid residue of Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Lys, Thr, His, Tyr, Nle or Ile, or a single bond.

Six peptides are specifically claimed, e.g. Asn-Pro-Gly-Ala-Ser -Ala-Ala-Pro-Cys-Cys- Val-Pro-Gln-Ala-Leu-Glu and Asn-Pro-Gly-Ala-Ser-Ala-Ser-Ala-Ser- Pro-Cys-Cys-Val-Ser -Gln-Asp-Leu-Glu- Pro-Leu-Thr-Ile-Leu.

USE - The peptides are useful for the treatment of fracture, wound, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, metatypical arthrosis, osteoporosis and periodontitis. The can suppress the rejective reaction after transportation.

Dwg.0/0

Derwent Class: B04

International Patent Class (Main): C07K-007/08

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; C07K-007/06; C07K-007/10; C07K-099-00

□ 2.

4/34/2 (Item 2 from file: 347)  
04381388 PEPTIDE OR ITS SALT

Pub. No.: 06-025288 [JP 6025288 A]  
Published: February 01, 1994 (19940201)  
Inventor: TANIHARA MASAO

FUJIWARA CHIE

Applicant: KURARAY CO LTD [000108] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)

Application No.: 04-207501 [JP 92207501]

Filed: July 10, 1992 (19920710)

International Class: [ 5 ] C07K-007/08; C07K-007/06; C07K-007/10;  
A61K-037/02; A61K-037/02; A61K-037/02; A61K-037/02; A61K-  
037/02; C07K-099/00

JAPIO Class: 14.1 (ORGANIC CHEMISTRY -- Organic Compounds); 14.4  
(ORGANIC CHEMISTRY -- Medicine)

Journal: Section: C, Section No. 1196, Vol. 18, No. 236, Pg. 91, May 06,  
1994 (19940506)

#### ABSTRACT

PURPOSE: To obtain a peptide, useful for treating fracture, wound, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, periodontosis, etc., and capable of effectively suppressing the rejection after organ transplantation.

CONSTITUTION: This peptide or its salt has the following general formula:  
H- X.up arrow.1 -Ala-X.up arrow.2-Pro-Cys-Cys-Val-X.up arrow.3-Gln-  
X.up arrow.4-Leu-Glu-X.up arrow.5-Y (X.up arrow.2 denotes an amino acid  
residue selected from the group consisting of Ser and Ala; X.up arrow.3  
denotes an amino acid residue selected from the group consisting of Ser  
and Pro; X.up arrow.4 denotes an amino acid residue selected from the  
group consisting of Ala and Asp; X.up arrow.1 and X.up arrow.5  
respectively denote single bonds or peptide fragments composed of 1-5  
amino acid residues selected from the group consisting of Gly, Ala, Val,  
Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Lys, Thr, His, Tyr, Nle and Ile; Y

denotes hydroxyl group or amino group) and transforming growth factor (TGF)-.beta.-like activity.

JAPIO (Dialog® File 347): (c) 2003 JPO & JAPIO. All rights reserved.

☐ 3. 4/34/3 (Item 3 from file: 345)

11636776

Basic Patent (No,Kind,Date): JP 6025288 A2 940201

PATENT FAMILY:

JAPAN (JP)

Patent (No,Kind,Date): JP 6025288 A2 940201

PEPTIDE OR ITS SALT (English)

Patent Assignee: KURARAY CO

Author (Inventor): TANIHARA MASAO; FUJIWARA CHIE

Priority (No,Kind,Date): JP 92207501 A 920710

Applic (No,Kind,Date): JP 92207501 A 920710

IPC: \* C07K-007/08; C07K-007/06; C07K-007/10; A61K-037/02; C07K-099-00

CA Abstract No: ; 121(01)000894M

Derwent WPI Acc No: ; C 94-077373

JAPIO Reference No: ; 180236C000091

Language of Document: Japanese

Inpadoc/Fam.& Legal Stat (Dialog® File 345): (c) 2003 EPO. All rights reserved.

select  
all none

Records 1-3 of 3 In long Format

Output ?

Format: Long

Output as: Browser

display/send

Modify ?

refine search

back to picklist

©1997-2003 The Dialog Corporation - Version 2.3

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-25288

(43)公開日 平成6年(1994)2月1日

| (51)Int.Cl. <sup>5</sup> | 識別記号  | 庁内整理番号  | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|-------|---------|-----|--------|
| C 0 7 K 7/08             | Z N A | 7537-4H |     |        |
| 7/06                     | Z     | 8318-4H |     |        |
| 7/10                     |       | 7537-4H |     |        |
| // A 6 1 K 37/02         | A B G |         |     |        |
|                          | A B J |         |     |        |

審査請求 未請求 請求項の数3(全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-207501

(22)出願日 平成4年(1992)7月10日

(71)出願人 000001085

株式会社クラレ

岡山県倉敷市酒津1621番地

(72)発明者 谷原 正夫

岡山県倉敷市酒津2045番地の1 株式会社  
クラレ内

(72)発明者 藤原 千絵

岡山県倉敷市酒津2045番地の1 株式会社  
クラレ内

(54)【発明の名称】 ペプチドまたはその塩

(57)【要約】

【構成】 下記の一般式

$H-X\uparrow 1-Ala-X\uparrow 2-Pro-Cys-Cys-Val-X\uparrow 3-Gln-X\uparrow 4-Leu-Glu-X\uparrow 5-Y$

(式中、X↑2 は Serおよび Alaよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑3 は Serおよび Proよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑4は Alaおよび Aspよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑1 およびX↑5 はそれぞれ単結合または Gly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Metおよび Ileよりなる群から選ばれる1〜5個のアミノ酸残基よりなるペプチド断片を表し、Yは水酸基またはアミノ基を表す)で示され、かつTGF-β様活性を有するペプチドまたはその塩。

【効果】 骨折、創傷、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病などの治療に有用であり、また臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制する。

1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】 一般式

H-X↑1-Ala-X↑2-Pro-Cys-Cys-Val-X↑3-Gln-X↑4-Leu-Glu-X↑5-Y

(式中、X↑2 は Ser および Ala よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑3 は Ser および Pro よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑4 は Ala および Asp よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑1 および X↑5 はそれぞれ単結合または Gly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Ile および Ile よりなる群から選ばれる 1~5 個のアミノ酸残基よりなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表す。) で示され、かつ TGF-β 様活性を有するペプチドまたはその塩。

## 【請求項2】 一般式

H-X↑6-A-X↑7-Y

(式中、A は式(1): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 1) で示されるペプチド断片、式(2): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号: 2) で示されるペプチド断片または式(3): Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu (配列番号: 3) で示されるペプチド断片を表し、X↑6 および X↑7 はそれぞれ単結合または Gly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Ile および Ile よりなる群から選ばれる 1~5 個のアミノ酸残基からなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表す。) で示される請求項1記載のペプチドまたはその塩。

## 【請求項3】 下記の

式(4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 4)、

式(5): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 5)、

式(6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号: 6)、

式(7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 7)、

式(8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (配列番号: 8) または

式(9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (配列番号: 9)

で示される請求項1記載のペプチドまたはその塩。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明はTGF-β様活性を有するペプチドまたはその塩に関する。本発明により提供さ

2

れるペプチドまたはその塩は、TGF-β様活性を有することから、骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの治療に有用であり、また臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制することができる。

## 【0002】

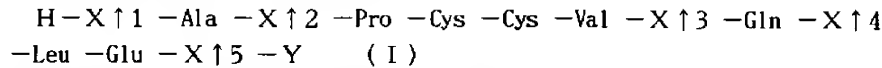
【従来の技術】TGF (トランスフォーミング グロウス ファクター transforming growth factor) -β は、非腫瘍細胞に腫瘍細胞的性質を発現させる腫瘍由来因子として発見され、その後、血小板、マクロファージ、骨、腎臓などの正常組織にも発見された(臨床免疫、第24巻、第146頁(1992年)参照)。活性型のTGF-βは分子量が約25 kDのホモダイマーとして存在し(プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)), 第85巻、第4715頁(1988年)参照)、ラットの正常線維芽細胞であるNRK-49F株に対して可逆的に形質転換を引き起こし、軟寒天培地での増殖を促進する作用を有するが、その他多くの細胞に対しては増殖抑制因子として作用することが明らかになっている(カレント トピックス イン ディベロップメンタル バイオロジー (Current Topics in Developmental Biology)、第24巻、第95頁(1990年)参照)。

【0003】TGF-βは血管の新生を促進し、かつ細胞外基質蛋白質の合成を促進することから、骨折の接合作用または創傷治療効果を有すると考えられる(サイエンス(Science)、第237巻、第1333頁(1987年)参照)。また、TGF-βは強力な免疫抑制作用をもつことから、臓器移植後の拒絶反応を抑制することが報告されている(プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)), 第87巻、第1591頁(1990年)参照)。さらに、TGF-βはリウマチ性関節炎の患者の関節液中に存在し、強力な炎症性メディエータであるIL-1の作用を中和することが報告されている(ザ ジャーナル オブ イムノロジー (J. Immunol.)), 第145巻、第2514頁(1990年)参照)。また、TGF-βは in vivo で骨形成を促進することから、骨粗鬆症または歯周炎の治療に有用であると考えられ(実験医学、第8巻、第345頁(1990年)参照)、実験的多発性硬化症モデル動物の発症を抑制することも報告されている(プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)), 第88巻、第2918頁(1991年)参照)。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記のTGF-βは、分子量が大きいことから免疫原性が高く、反復投与によ

りアナフィラキシーショックを引き起こす虞れがある。また生体内に投与しても数分内に血中から消失し、有効性が失われる。また大量に投与することにより、肝臓および腎臓に対する毒性、非特異的な免疫抑制などの種々の副作用が発現する可能性がある。しかるに、本発明の目的は、TGF-βよりも副作用が少なく、かつ強いT\*



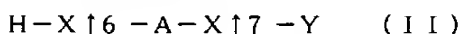
(式中、X↑2はSerおよびAlaよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑3はSerおよびProよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑4はAlaおよびAspよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑1およびX↑5はそれぞれ単結合またはGly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、IleおよびIleよりなる群から選ばれる1〜5個のアミノ酸残基よりなるペプチド断片を表し、Yは水酸基またはアミノ基を表す)で示されるペプチドまたはその塩を提供することによって達成される。

【0006】本明細書においては各種アミノ酸残基を次の略号で記述する。

Ala : L-アラニン残基  
Arg : L-アルギニン残基  
Asn : L-アスパラギン残基  
Asp : L-アスパラギン酸残基  
Cys : L-システイン残基  
Gln : L-グルタミン残基  
Glu : L-グルタミン酸残基  
Gly : グリシン残基  
His : L-ヒスチジン残基  
Ile : L-イソロイシン残基  
Leu : L-ロイシン残基  
Lys : L-リシン残基  
Phe : L-フェニルアラニン残基  
Pro : L-プロリン残基  
Ser : L-セリン残基  
Thr : L-トレオニン残基  
Trp : L-トリプトファン残基  
Tyr : L-チロシン残基  
Val : L-バリン残基  
Nle : L-ノルロイシン残基

また、本明細書においては、常法に従ってペプチドのアミノ酸配列を、そのN末端のアミノ酸残基が左側に位置し、C末端のアミノ酸残基が右側に位置するように記述する。

【0007】上記一般式(I)で示されるペプチドのうち、下記一般式(II)



(式中、Aは式(1): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 1)で示されるペプチド※50

\*GF-β様活性を有するペプチドを提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、上記の目的は、下記の一般式(I)

※断片、式(2): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp p Leu Glu (配列番号: 2)で示されるペプチド断片または式(3): Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu (配列番号: 3)で示されるペプチド断片を表し、X↑6およびX↑7はそれぞれ単結合またはGly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、IleおよびIleよりなる群から選ばれる1〜5個のアミノ酸残基からなるペプチド断片を表し、Yは水酸基またはアミノ基を表す)で示されるペプチドが好ましい。

【0008】本発明により提供されるペプチドの代表例を次に示す。

式(4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 4)、

式(5): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 5)、

式(6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号: 6)、

式(7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 7)、

式(8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (配列番号: 8)および

式(9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (配列番号: 9)。

【0009】本発明のペプチドの塩は生理学的に許容される塩であり、その塩としては、例えば、塩酸、硫酸、燐酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、オレイン酸、パルミチン酸などの酸との塩; ナトリウム、カリウム、カルシウム、アルミニウムなどのアルカリ金属またはアルカリ土類金属の水酸化物または炭酸塩との塩; トリエチルアミン、ベンジルアミン、ジエタノールアミン、トブチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、アルギニンなどとの塩などが挙げられる。

【0010】本発明のペプチドは、ペプチドの合成において通常用いられる方法、例えば固相合成法または液相合成法によって調製されるが、固相合成法が操作上簡便である(例えば、日本生化学会編「続生化学実験講座2 タンパク質の化学(下)」、第641-694頁(昭和62年5月20日 株式会社東京化学同人発行)参照)。

【0011】本発明のペプチドの固相合成法による調製は、例えば、スチレンージビニルベンゼン共重合体などの反応溶媒に不溶性である重合体に目的とするペプチドのC末端に対応するアミノ酸をそれが有する $\alpha$ -COOH基を介して結合させ、次いで該アミノ酸に目的とするペプチドのN末端の方向に向かって、対応するアミノ酸またはペプチド断片を該アミノ酸またはペプチド断片が有する $\alpha$ -COOH基以外の $\alpha$ -アミノ基などの官能基を保護したうえで縮合させて結合させる操作と、該結合したアミノ酸またはペプチド断片における $\alpha$ -アミノ基などのペプチド結合を形成するアミノ基が有する保護基を除去する操作とを順次繰り返すことによってペプチド鎖を伸長させ、目的とするペプチドに対応するペプチド鎖を形成し、次いで該ペプチド鎖を重合体から脱離させ、かつ保護されている官能基から保護基を除去することにより目的とするペプチドを得、次いでこれを精製することによって実施される。ここで、ペプチド鎖の重合体からの脱離および保護基の除去は、フッ化水素を用いて同時に行うのが副反応を抑制する観点から好ましい。また、得られたペプチドの精製は逆相液体クロマトグラフィーで行うのが効果的である。

【0012】また、本発明のペプチドの塩は、通常の塩生成反応を利用することにより調製される。

【0013】後述の試験例から明らかとなり、本発明のペプチドおよびその塩（以下、これらをペプチド類と略称する）は、TGF- $\beta$ 様活性を有し、かつ毒性試験において低毒性であることが確認されている。

【0014】以上の結果から、本発明のペプチド類は骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの治療に有用である。また、本発明のペプチド類は、臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制する。

【0015】本発明のペプチド類は、骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの患者に投与することにより、上記罹患者の症状を軽減することができる。

【0016】ペプチド類の有効な活性発現のための投与量は、疾病、患者の重篤度、薬物に対する忍容性などにより異なるが、通常成人1日当たり、 $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $2 \text{g}/\text{kg}$ であり、好ましくは $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $200 \text{mg}/\text{kg}$ である。

【0017】投与形態としてはペプチド類を5%ブドウ糖液や生理食塩水などの生理学的に許容し得る溶液に溶解させて得られる溶液が好ましく、また該溶液は薬理的に許容される種々の添加剤を含んでいてもよい。

【0018】投与方法としては静脈投与、皮下投与、腹腔投与、関節内投与、経皮投与などが挙げられ、さらにペプチド類をカプセル化またはリボソーム化することにより経口投与も可能である。

【0019】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明する。なお、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

#### 【0020】実施例1

式(4)：Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala LeuGlu（配列番号：4）で示されるペプチドをペプチド自動合成装置を用いて固相合成法により合成した。すなわち、4-[N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)- $\alpha$ -ベンジル-L-グルタミルオキシメチル]-フェニルアセトアミドメチル基を0.70ミリモル/g（樹脂）の割合で有するスチレンージビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比：99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMグルタミン酸、t-Boc-L-Glu(OBzl)〕0.1ミリモルを用い、ペプチドのN端に向かって順次アミノ酸を結合させた。結合反応において、アミノ酸として、米国アプライド・バイオシステムズ社製のN- $\alpha$ -( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)-L-グルタミン〔t-Boc グルタミン〕、N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)-L-ロイシン〔t-Boc ロイシン〕、N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)-L-プロリン〔t-Boc プロリン〕、N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)-L-グリシン〔t-Boc グリシン〕、N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)-L-アスパラギン〔t-Boc アスパラギン〕、N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)-O-ベンジル-L-セリン〔t-Boc セリン〕、N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)-S-( $p$ -メトキシベンジル)-L-システイン〔t-Boc システイン〕、N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)-L-バリン〔t-Boc バリン〕、N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)-L-アラニン〔t-Boc アラニン〕をそれぞれ1ミリモル用いた。

【0021】得られたペプチドについて株式会社ペプチド研究所製のHF反応装置I型を用いて脱保護と固相からの脱離を行った。粗生成物をミリポア・ウォーターズ社製分取用高速液体クロマトグラフ〔カラム：デルタパックC18 47×300mmプレッパック1000加圧モジュール付〕で精製した。得られた精製ペプチドを島津製作所株式会社製LC6A分析用高速液体クロマトグラフ〔カラム：東ソー株式会社製TSK gel ODS-80TM CTR、移動相：トリフルオロ酢酸を0.05容量%含有するアセトニトリルと水の混合溶媒（アセトニトリル濃度を30分間で5容量%から50容量%に変化させた）〕に付したところ、18.8minに単一のピークが示された。FAB法マスペクトルにより求めた精製ペプチドの分子量は1527であった（理論値：1527.72）。

#### 【0022】実施例2～6および比較例1

式(5)：Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro IleVal（配列番号：5）で示されるペプチド（実施例2）、式(6)：Ala Pro Glu Ala Se

7

r Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号: 6) で示されるペプチド (実施例3)、式 (7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 7) で示されるペプチド (実施例4)、式 (8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (配列番号: 8) で示されるペプチド (実施例5)、式 (9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (配列番号: 9) で示されるペプチド (実施例6)、および式 (10): Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser (配列番号: 10) で示されるペプチド (比較例1) を実施例1と同様の方法により合成した。

【0023】実施例2および実施例4では4-[N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)- $\alpha$ -バリルオキシメチル]-フェニルアセトアミドメチル基を0.68ミリモル/g (樹脂) の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体 (スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99対1) からなる粒状樹脂 (米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMバリル、 $t$ -Boc-L-Val) 0.1ミリモルを用い、実施例3では4-[N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)- $\alpha$ -ベンジル- $\alpha$ -グルタミルオキシメチル]-フェニルアセトアミドメチル基を0.70ミリモル/g (樹脂) の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体 (スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99対1) からなる粒状樹脂 (米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMグルタミン酸、 $t$ -Boc-L-Glu(OBzl)) 0.1ミリモルを用い、実施例5及び実施例6では4-[N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)- $\alpha$ -ロイシルオキシメチル]-フェニルアセトアミドメチル基を0.68ミリモル/g (樹脂) の割合で

8

有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体 (スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99対1) からなる粒状樹脂 (米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMロイシン、 $t$ -Boc-L-Leu) 0.1ミリモルを用い、比較例1では4-[N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)- $\alpha$ -ベンジル- $\alpha$ -セリルオキシメチル]-フェニルアセトアミドメチル基を0.72ミリモル/g (樹脂) の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体 (スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99対1) からなる粒状樹脂 (米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMセリン、 $t$ -Boc-L-Ser(Bzl)) 0.1ミリモルを用いた。

【0024】また、アミノ酸としては、実施例1で用いたものに加えて米国アプライド・バイオシステムズ社製のN-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)- $\alpha$ -(2-ブromoベンジルオキシカルボニル)- $\alpha$ -チロシン [ $t$ -Boc チロシン]、N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)- $\alpha$ -イソロイシン [ $t$ -Boc イソロイシン]、N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)- $\alpha$ -ベンジル- $\alpha$ -グルタミン酸 [ $t$ -Boc グルタミン酸]、N-( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)- $\beta$ -ベンジル- $\alpha$ -アスパラギン酸 [ $t$ -Boc アスパラギン酸]、N- $\alpha$ -( $\alpha$ -ブトキシカルボニル)-NInd- $\alpha$ -ホルミル- $\alpha$ -トリプトファン [ $t$ -Boc トリプトファン] を用いた。

【0025】得られたそれぞれのペプチドについて実施例1におけると同様にして脱保護と固相からの脱離を行い、粗生成物を精製した。それぞれの精製ペプチドについて、分析用高速液体クロマトグラフにおける溶出時間およびFAB法マスマスペクトルによる分子量測定結果を第1表にまとめて示す。

【0026】

【表1】



第 1 表

| 実施例<br>または<br>比較例 | 溶出時間<br>(min) | 精製ペプチド |      | (理論値)   |
|-------------------|---------------|--------|------|---------|
|                   |               | 式番号    | 分子量  |         |
| 実施例 2             | 23.9          | (5)    | 1620 | 1620.97 |
| 実施例 3             | 18.0          | (6)    | 1658 | 1659.79 |
| 実施例 4             | 23.8          | (7)    | 1680 | 1680.98 |
| 実施例 5             | 25.5          | (8)    | 2112 | 2115.38 |
| 実施例 6             | 25.0          | (9)    | 2111 | 2111.39 |
| 比較例 1             | 23.4          | (10)   | 1631 | 1629.78 |

## 【0027】試験例1

コンカナバリンA刺激マウス脾臓細胞の増殖抑制試験  
BALB/cマウス脾臓細胞を、コンカナバリンA: 3  
 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2-メルカプトエタノール: 50  $\mu\text{M}$ 、牛胎  
児血清: 13%の割合でそれぞれ含有するRPMI-1  
640培地に分散し、5000個/ウエルの割合で96  
ウエルプレートに分注し、7%CO<sub>2</sub>存在下37℃で  
7日間培養した。培養後プロピディウムアイオダイドで  
生細胞のDNAを標識し、蛍光強度を測定することによ\*

\*り生細胞数をカウントした。ペプチドは100  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
1、TGF- $\beta$ は1 ng/mlの濃度になるようにそれぞれ  
コンカナバリンA刺激直前に添加した。コンカナバリン  
Aを加えないウエルに対するコンカナバリンAのみを加  
えたウエルの生細胞数の増加を1として、ペプチドまた  
はTGF- $\beta$ を加えた時の生細胞数の減少を抑制率とし  
て表した。結果を第2表に示す。

【0028】

【表2】

第 2 表

| 実施例または<br>比較例 | ペ プ チ ド          | 抑制率 (%) |
|---------------|------------------|---------|
| —             | T G F - $\beta$  | 85      |
| 実施例 1         | 式 (4) で表されるペプチド  | 60      |
| 実施例 2         | 式 (5) で表されるペプチド  | 70      |
| 実施例 3         | 式 (6) で表されるペプチド  | 65      |
| 実施例 4         | 式 (7) で表されるペプチド  | 73      |
| 実施例 5         | 式 (8) で表されるペプチド  | 70      |
| 実施例 6         | 式 (9) で表されるペプチド  | 72      |
| 比較例 1         | 式 (10) で表されるペプチド | 2       |

【0029】第2表のとおり、TGF- $\beta$ の抑制率が85%であるのに対して、実施例1～実施例6で得られたペプチドの抑制率は60%～73%であり、本発明のペプチドがTGF- $\beta$ 様の活性を示すことは明らかである。

#### 【0030】試験例2

##### 軟寒天中のコロニー形成試験

2.5ng/mlのEGF、10%の牛胎児血清及び0.5%の寒天を含むイーグルのMEM培地にNRK-49F細胞を1000個/シャーレの割合で直径10cmのシャーレに撒き、7%CO<sub>2</sub>存在下37℃で7日間培養した。ニュートラルレッドで生細胞を染色し、コロニー100個あたりの70 $\mu$ m以上の直径を有するコロニーの割合を求めた。その結果、実施例1で得られたペプチドを300 $\mu$ g/mlの濃度で添加したときに平均58%のコロニーが形成され、何も添加しないコントロールの平均33%と比較して有意にコロニー形成が促進された。

#### 【0031】

【発明の効果】本発明により提供されるペプチド類は、骨折、創傷、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病などの治療に有効であり、また臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制することができる。

#### 【0032】

##### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

\*トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

##### 配列

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu  
1 5 10

#### 【0033】配列番号：2

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

##### 配列

Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu  
1 5 10

#### 【0034】配列番号：3

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

40 配列の種類：ペプチド

##### 配列

Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu  
1 5 10

#### 【0035】配列番号：4

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

1 3

1 4

配列

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu

1

5

10

15

【0036】配列番号: 5

\*トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 16

配列の種類: ペプチド

配列の型: アミノ酸

\*

配列

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val

1

5

10

15

【0037】配列番号: 6

10※トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 16

配列の種類: ペプチド

配列の型: アミノ酸

※

配列

Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu

1

5

10

15

【0038】配列番号: 7

★トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 16

配列の種類: ペプチド

配列の型: アミノ酸

★

配列

Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val

1

5

10

15

【0039】配列番号: 8

☆トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 21

配列の種類: ペプチド

配列の型: アミノ酸

☆

配列

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu

1

5

10

15

Pro Leu Thr Ile Leu

20

【0040】配列番号: 9

30◆トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 21

配列の種類: ペプチド

配列の型: アミノ酸

◆

配列

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu

1

5

10

15

Pro Leu Pro Ile Leu

20

【0041】配列番号: 10

\*トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 14

配列の種類: ペプチド

配列の型: アミノ酸

\* 40

配列

Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser

1

5

10

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>5</sup>

A 61 K 37/02

識別記号

ACK

ADA

片内整理番号

8314-4C

F I

技術表示箇所

(9)

特開平6-25288

ADF

C07K 99:00

AN 1994:400891 HCAPLUS  
 DN 121:894  
 TI Peptides or their salts having transforming growth factor  
 (TGF)-.beta.-like activity  
 IN Tanihara, Masao; Fujiwara, Che  
 PA Kuraray Co, Japan  
 SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 9 pp.  
 CODEN: JKXXAF  
 DT Patent  
 LA Japanese  
 IC ICM C07K007-08  
 ICS C07K007-06; C07K007-10  
 ICA A61K037-02  
 ICI C07K099-00  
 CC 1-7 (Pharmacology)  
 Section cross-reference(s): 34

FAN.CNT 1

|      | PATENT NO.     | KIND | DATE         | APPLICATION NO. | DATE         |
|------|----------------|------|--------------|-----------------|--------------|
| PI   | JP 06025288    | A2   | 19940201     | JP 1992-207501  | 19920710 <-- |
| PRAI | JP 1992-207501 |      | 19920710 <-- |                 |              |
| OS   | MARPAT 121:894 |      |              |                 |              |

AB H-X1-Ala-X2-Pro-Cys-Cys-Val-X3-Gln-X4-Leu-Glu-X5-Y [X2 = Ser, Ala; X3 = Ser, Pro; X4 = Ala, Asp; X1, X5 = single bond, peptide fragment having 1-5 amino acid residue(s) chosen from Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Lys, Thr, His, Tyr, Nle, and Ile; Y = OH, NH2], having TGF-.beta.-like activity, are useful for treatment of fractures, wounds, rheumatoid arthritis, **osteoarthritis**,

**osteoporosis**, periodontitis, multiple sclerosis, etc.

Asn-Pro-Gly-Ala-Ser-Ala-Ala-Pro-Cys-Cys-Val-Pro-Gln-Ala-Leu-Glu (prepn. given) (at 100 .mu.g/mL) inhibited the growth of Con A-stimulated murine spleen cells by 60%, vs. 85%, for TGF-.beta..

ST peptide transforming growth factor beta like; TGF beta like peptide therapeutic; **fracture** wound treatment peptide prepn; rheumatoid arthritis **osteoporosis** treatment peptide; **osteoarthritis** periodontitis treatment peptide; multiple sclerosis treatment peptide

IT Peptides, biological studies  
 RL: BIOL (Biological study)  
 (TGF-.beta.-like, for therapeutics)

IT Immunosuppressants  
 Wound healing promoters  
 (peptides having transforming growth factor-.beta.-like activities as)

IT Multiple sclerosis  
**Osteoporosis**  
 (treatment of, peptides having transforming growth factor-.beta.-like activities for)

IT Inflammation inhibitors  
 (antiarthritics, peptides having transforming growth factor-.beta.-like activities for)

IT Inflammation inhibitors  
 (antirheumatics, peptides having transforming growth factor-.beta.-like activities for)

IT Periodontium  
 (disease, periodontitis, treatment of, peptides having transforming growth factor-.beta.-like activities for)

IT Bone, disease  
 (**fracture**, treatment of, peptides having transforming growth factor-.beta.-like activities for)

IT Animal growth regulators  
 RL: BIOL (Biological study)  
 (.beta.-transforming growth factors, peptides having activities like, for therapeutics)

IT 3978-80-1, N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-tyrosine 4530-20-5 7536-55-2,  
 N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-asparagine 13139-15-6, N-(tert-Butoxycarbonyl)-  
 L-leucine 13139-16-7, N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-isoleucine 13574-13-5  
 13726-67-5, N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-aspartic acid 13726-85-7,  
 N.alpha.-(tert-Butoxycarbonyl)-L-glutamine 13734-41-3,  
 N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-valine 15761-38-3, N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-  
 alanine 15761-39-4, N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-proline 18942-46-6,  
 N-(tert-Butoxycarbonyl)-S-(p-methoxybenzyl)-L-cysteine 23680-31-1,  
 N-(tert-Butoxycarbonyl)-O-benzyl-L-serine 47355-10-2  
 RL: RCT (Reactant); RACT (Reactant or reagent)  
 (peptide coupling of)

IT 155566-20-4P 155566-21-5P 155566-22-6P 155566-23-7P 155566-24-8P  
 155606-60-3P  
 RL: SPN (Synthetic preparation); PREP (Preparation)  
 (prepn. and transforming growth factor-.beta.-like activities of)

IT 47355-10-2  
 RL: RCT (Reactant); RACT (Reactant or reagent)  
 (peptide coupling of)

RN 47355-10-2 HCAPLUS  
 CN L-Tryptophan, N-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-1-formyl- (9CI) (CA INDEX NAME)

Absolute stereochemistry.

09/421,545

JP6-25288-A



**MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**

|   |   |
|---|---|
| <b>(19)【発行国】</b><br>日本国特許庁 ( J P )  | <b>(19)[ISSUING COUNTRY]</b><br>Japan Patent Office (JP)  |
| <b>(12)【公報種別】</b><br>公開特許公報 ( A )   | <b>(12)[GAZETTE CATEGORY]</b><br>Laid-open Kokai Patent (A)   |
| <b>(11)【公開番号】</b><br>特開平 6 - 2 5 2 8 8  | <b>(11)[KOKAI NUMBER]</b><br>Unexamined Japanese Patent (1994-25288)<br>Heisei 6-25288  |
| <b>(43)【公開日】</b><br>平成 6 年 ( 1 9 9 4 ) 2 月 1 日  | <b>(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION]</b><br>(1994.2.1)  |
| <b>(54)【発明の名称】</b><br>ペプチドまたはその塩  | <b>(54)[TITLE of the Invention]</b><br>PEPTIDE OR ITS SALT  |
| <b>(51)【国際特許分類第 5 版】</b><br>C07K 7/08<br>7537-4H<br>7/06<br>8318-4H<br>7/10<br>7537-4H<br>// A61K 37/02<br>ABG<br>ABJ<br>ACK<br>ADA<br>8314-4C<br>ADF<br>C07K 99:00 | <b>(51)[IPC Int. Cl. 5]</b><br>C07K 7/08 ZNA 7537-4H<br>7/06 Z 8318-4H<br>Z 7/10 7537-4H<br>// A61K 37/02 ABG<br>ABJ<br>ACK<br>ADA 8314-4C<br>ADF<br>C07K 99:00 |
| <b>【審査請求】</b> 未請求   | <b>[REQUEST FOR EXAMINATION]</b> No   |

【請求項の数】 3

[NUMBER OF CLAIMS] 3

【全頁数】 9

[NUMBER OF PAGES] 9

(21) 【出願番号】

(21)[APPLICATION NUMBER]

特願平4-207501

Japanese Patent Application (1992-207501)  
Heisei 4-207501

(22) 【出願日】

(22)[DATE OF FILING]

平成4年(1992)7月10日  
(1992.7.10)

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

[ID CODE]

000001085

000001085

【氏名又は名称】

[NAME OR APPELLATION]

株式会社クラレ

Kuraray Co., Ltd.

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

岡山県倉敷市酒津1621番地

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

谷原 正夫

Tanihara Masao

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

岡山県倉敷市酒津2045番地  
の1 株式会社クラレ内

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

**【氏名】**

藤原 千絵

**[NAME OR APPELLATION]**

Fujiwara Chie

**【住所又は居所】**岡山県倉敷市酒津 2 0 4 5 番地  
の 1 株式会社クラレ内**[ADDRESS or DOMICILE]****(57) 【要約】****(57)[ABSTRACT of the Disclosure]****【構成】**

下記の一般式

$$\begin{array}{l} \text{H}-\text{X}\uparrow 1-\text{Ala}-\text{X}\uparrow 2-\text{Pro} \\ -\text{Cys}-\text{Cys}-\text{Val}-\text{X}\uparrow 3-\text{Gln} \\ -\text{X}\uparrow 4-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{X}\uparrow 5- \\ \text{Y} \end{array}$$

(式中、X↑2 は Ser および Ala よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑3 は Ser および Pro よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑4 は Ala および Asp よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑1 および X↑5 はそれぞれ単結合または Gly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Nle および Ile よりなる群から選ばれる 1～5 個のアミノ酸残基よりなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表す) で示され、かつ TGF-β 様活性を有するペプチドまたは

**[CONSTITUTION]**

The following general formula

$$\begin{array}{l} \text{H}-\text{X}\uparrow 1-\text{Ala}-\text{X}\uparrow 2-\text{Pro}-\text{Cys}-\text{Cys}-\text{Val}-\text{X}\uparrow 3-\text{Gln}-\text{X} \\ \uparrow 4-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{X}\uparrow 5-\text{Y} \end{array}$$

(X↑2, expressing the amino acid residue chosen from the group which is made of Ser and Ala in the Formula.

X↑3 expresses the amino acid residue chosen from the group which is made of Ser and Pro, x↑4 expresses the amino acid residue chosen from the group which is made of Ala and Asp, x↑1 and X↑5 express the peptide fragment which is made of a 1-5 amino acid residue chosen from the group which is made of a single bond or Gly,Ala,Val,Arg,Asn,Ser,Phe,Pro,Leu,Glu,Asp,Lys,Thr,His,Tyr,Nle, and Ile, respectively, y expresses a hydroxyl group or an amino group.) It shows above, and the peptide or its salt which has a TGF-(beta-) like activity.



その塩。

**【効果】**

骨折、創傷、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病などの治療に有用であり、また臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制する。

**[ADVANTAGE]**

It is useful for the treatment of fracture, a wound, multiple sclerosis, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, etc.

Moreover, the rejection after an organ transplant is suppressed effectively.

**【特許請求の範囲】**

**[CLAIMS]**

**【請求項 1】**

一般式

$H-X \uparrow 1-Ala-X \uparrow 2-Pro$   
 $-Cys-Cys-Val-X \uparrow 3-Gln$   
 $-X \uparrow 4-Leu-Glu-X \uparrow 5-$   
 $Y$

(式中、 $X \uparrow 2$  は Ser および Ala よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、 $X \uparrow 3$  は Ser および Pro よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、 $X \uparrow 4$  は Ala および Asp よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、 $X \uparrow 1$  および  $X \uparrow 5$  はそれぞれ単結合または Gly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Nle および Ile よりなる群から選ばれる 1～5 個のアミノ酸残基よりなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表す。) で示され、かつ TGF- $\beta$

**[CLAIM 1]**

General formula

$H-X \uparrow 1-Ala-X \uparrow 2-Pro-Cys-Cys-Val-X \uparrow 3-Gln-X$   
 $\uparrow 4-Leu-Glu-X \uparrow 5-Y$

( $X \uparrow 2$ , expressing the amino acid residue chosen from the group which is made of Ser and Ala in the Formula,  $x \uparrow 3$  expresses the amino acid residue chosen from the group which is made of Ser and Pro,  $x \uparrow 4$  expresses the amino acid residue chosen from the group which is made of Ala and Asp,  $x \uparrow 1$  and  $X \uparrow 5$  express the peptide fragment which is made of a 1-5 amino acid residue chosen from the group which is made of a single bond or Gly,Ala,Val,Arg,Asn,Ser,Phe,Pro,Leu,Glu,Asp,Lys,Thr,His,Tyr,Nle, and Ile, respectively, y expresses a hydroxyl group or an amino group.) It shows above, and the peptide or its salt which has a TGF-(beta-) like activity.

様活性を有するペプチドまたはその塩。

**【請求項 2】**

一般式



(式中、Aは式(1):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号:1)で示されるペプチド断片、式(2):Ala Ser Pro Cys Cys Val ProGln Asp Leu Glu (配列番号:2)で示されるペプチド断片または式(3):Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu (配列番号:3)で示されるペプチド断片を表し、X↑6 および X↑7 はそれぞれ単結合または Gly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Nle および Ile よりなる群から選ばれる1~5個のアミノ酸残基からなるペプチド断片を表し、Yは水酸基またはアミノ基を表す。)で示される請求項1記載のペプチドまたはその塩。

**[CLAIM 2]**

General formula



(In the Formula, A is a peptide fragment shown by Formula (1):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (sequence number: 1), formula (2): The peptide fragment shown by Ala Ser Pro Cys Cys Val ProGln Asp Leu Glu (sequence number: 2)

Or Formula (3): Expressing the peptide fragment shown by Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu (sequence number: 3), x↑6 and X↑7 express the peptide fragment which is made of a 1-5 amino acid residue chosen from the group which is made of a single bond or Gly,Ala,Val,Arg,Asn,Ser,Phe,Pro,Leu,Glu,Asp,Lys,Thr,His,Tyr,Nle, and Ile, respectively, y expresses a hydroxyl group or an amino group. )

The peptide or its salt of Claim 1 shown now.

**【請求項 3】**

下記の

式(4):Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号:4)、式(5):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号:5)、

**[CLAIM 3]**

Following

Formula (4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (sequence number: 4), formula (5): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (sequence number: 5), formula (6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp

式(6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Leu Glu (sequence number: 6), formula (7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Asp Leu Glu (配列番号: 6)、Leu Pro Ile Val (sequence number: 7), formula (7): Ala Ser Pro Cys Cys (8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Leu Pro Ile Val (配列番号: 7)、(sequence number: 8)  
 式(8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Or formula (9): The peptide or its salt of Claim 1 Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln shown by Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (配列番号: 8) または Leu (sequence number: 9).  
 式(9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (配列番号: 9)  
 で示される請求項1記載のペプチドまたはその塩。

**【発明の詳細な説明】****[DETAILED DESCRIPTION of the INVENTION]****【0001】****[0001]****【産業上の利用分野】****[INDUSTRIAL APPLICATION]**

本発明はTGF- $\beta$ 様活性を有するペプチドまたはその塩に関する。本発明により提供されるペプチドまたはその塩は、TGF- $\beta$ 様活性を有することから、骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの治療に有用であり、また臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制することができる。

This invention relates to the peptide or its salt which has a TGF-(beta-) like activity. Since the peptide or its salt which this invention provides has a TGF-(beta-) like activity, it is useful for the treatment of fracture, a wound, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, multiple sclerosis, etc. Moreover, the rejection after an organ transplant can be suppressed effectively.

【 0 0 0 2 】

[0002]

## 【従来の技術】

T G F (トランスフォーミング  
グロウス ファクター  
transforming growth factor) -  
β は、非腫瘍細胞に腫瘍細胞的  
性質を発現させる腫瘍由来因子  
として発見され、その後、血小  
板、マクロファージ、骨、腎臓  
などの正常組織にも発見された  
(臨床免疫、第 24 巻、第 146  
頁 (1992 年)参照)。活性型の T  
G F - β は分子量が約 2 5 k D  
のホモダイマーとして存在し  
(プロシーディングス オブ  
ザ ナショナル アカデミー  
オブ サイエンス オブ ザ  
ユナイテッド ステイツ オブ  
アメリカ (Proc. Natl. Acad.  
Sci.USA.)、第 85 巻、第 4715  
頁 (1988 年)参照)、ラットの正  
常線維芽細胞である NR K - 4  
9 F 株に対して可逆的に形質転  
換を引き起こし、軟寒天培地で  
の増殖を促進する作用を有する  
が、その他多くの細胞に対して  
は増殖抑制因子として作用する  
ことが明らかになっている (カ  
レント トピックス イン デ  
イベロップメンタル バイオロ  
ジ ー (Current Topics in  
Developmental Biology)、第 24  
巻、第 95 頁 (1990 年)参照)。

## [PRIOR ART]

TGF(transforming growth factor  
transforming growth factor)- (beta-) is  
discovered as a tumor origin factor which  
makes the non-oncocyte express an  
oncocyte-characteristic, after that, normal  
tissues, such as blood platelets, macrophage, a  
bone, and a kidney, also discovered (refer to a  
clinical immunology, Volume 24, and Page 146  
(1992)).

As for activated TGF- (beta-), molecular weight  
exists as a homo dimer of about 25 kD(s).

(Proceedings of the National Academy of the  
Sciences of the United States of America  
(Proc.Natl.Acad.Sci.USA.).)

It causes transforming reversibly to NRK-49F  
strain which is the normal fibroblast of Volume  
85, refer Page 4715 (1988), and a rat, it has the  
effect which promotes propagation by the soft  
agar.

However, it becomes clearly to act as a  
growth-inhibition factor to many cell in addition  
to this (refer Current Topics in Developmental  
Biology (Current Topics in Developmental  
Biology), Volume 24, and Page 95 (1990)).

## 【0003】

TGF- $\beta$ は血管の新生を促進し、かつ細胞外基質蛋白質の合成を促進することから、骨折の接合作用または創傷治癒効果を有すると考えられる (サイエンス(Science)、第 237 巻、第 1333 頁 (1987 年)参照)。また、TGF- $\beta$ は強力な免疫抑制作用をもつことから、臓器移植後の拒絶反応を抑制することが報告されている (プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシーズ オブ ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.))、第 87 巻、第 1591 頁 (1990 年)参照)。さらに、TGF- $\beta$ はリウマチ性関節炎の患者の関節液中に存在し、強力な炎症性メディエータである IL-1 の作用を中和することが報告されている (ザ ジャーナル オブ イムノロジー (J. Immunol.))、第 145 巻、第 2514 頁 (1990 年)参照)。また、TGF- $\beta$ は in vivo で骨形成を促進することから、骨粗鬆症または歯周炎の治療に有用であると考えられ (実験医学、第 8 巻、第 345 頁 (1990 年)参照)、実験的多発性硬化症モデル動物の発症を抑制することも報告されている (プロシーディングス オブ ザ ナショナル

## [0003]

TGF- (beta-) promotes neogenesis of the blood vessel, and since a synthesis of an extra-cellular substrate protein is promoted, it is thought that it has a joining effect of fracture or the wound healing effect (refer a science (Science), Volume 237, and Page 1333 (1987)). Moreover, since TGF- (beta-) has a forceful immunosuppressive effect, suppressing the rejection after an organ transplant is reported (refer to the Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.), Volume 87, and Page 1591 (1990)).

Furthermore, TGF- (beta-) exists in the synovial fluid of the patient of a rheumatic arthritis, neutralizing an effect of IL-1 which is a forceful inflammatory mediator is reported (refer to the Journal of Immunology (J. Immunol.), Volume 145, and Page 2514 (1990)).

Moreover, TGF- (beta-) from promoting an osteogenesis in-vivo

It is thought that it is useful for the treatment of osteoporosis or the periodontitis (refer to the experimental medicine, Volume 8, and Page 345 (1990)), suppressing onset of an experimental multiple sclerosis model animal is also reported (it Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.)).

Refer to Volume 88 and Page 2918 (1991).

アカデミー オブ サイエンス  
 ーズ オブザ ユナイテッド  
 ステイツ オブ アメリカ  
 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)、  
 第 88 巻、第 2918 頁 (1991 年  
 参照)。

【 0 0 0 4 】

[0004]

【発明が解決しようとする課題】

上記の TGF- $\beta$  は、分子量が大きいことから免疫原性が高く、反復投与によりアナフィラキシーショックを引き起こす虞れがある。また生体内に投与しても数分内に血中から消失し、有効性が失われる。また大量に投与することにより、肝臓および腎臓に対する毒性、非特異的な免疫抑制などの種々の副作用が発現する可能性がある。しかるに、本発明の目的は、TGF- $\beta$  よりも副作用が少なく、かつ強い TGF- $\beta$  様活性を有するペプチドを提供することにある。

**[PROBLEM to be solved by the Invention]**

Since molecular weight is large, above-mentioned TGF- (beta-) has a high immunogenicity, and has a possibility that a repetitive administration may cause the anaphylactic shock.

Moreover, even if it administers in the living body, a blood shell loss is carried out within several minutes, and effectiveness is lost.

Moreover, by administering in large quantities, various side effects, such as a toxicity with respect to a liver and a kidney and non-specific immunosuppression, may express.

However, objective of the invention is to provide the peptide which has a strong TGF-(beta-) like activity with few side effects rather than TGF-(beta-).

【 0 0 0 5 】

[0005]

【課題を解決するための手段】

本発明によれば、上記の目的は、下記の一般式 (I)



**[MEANS to solve the Problem]**

According to this invention, the above-mentioned objective, the following general formula (I)

Pro — Cys — Cys — Val — X H-X ↑ 1-Ala-X ↑ 2-Pro-Cys-Cys-Val-X ↑ 3-Gln-X  
 ↑ 3 — Gln — X ↑ 4 ↑ 4-Leu-Glu-X ↑ 5-Y (I)

— Leu — Glu — X ↑ 5 — Y (In the Formula, X ↑ 2 expresses the amino acid  
 (I) residue chosen from the group which consists

(式中、X ↑ 2 は Ser および of Ser and Ala, x ↑ 3 expresses the amino acid  
 Ala よりなる群から選ばれるア residue chosen from the group which consists  
 ミノ酸残基を表し、X ↑ 3 は of Ser and Pro, x ↑ 4 expresses the amino acid  
 Ser および Pro よりなる群から residue chosen from the group which consists  
 選ばれるアミノ酸残基を表し、 of Ala and Asp, x ↑ 1 and X ↑ 5 express the  
 X ↑ 4 は Ala および Asp より peptide fragment which consists of a 1-5 amino  
 なる群から選ばれるアミノ酸残 acid residue chosen from the group which  
 基を表し、X ↑ 1 および X ↑ 4 consists of a single bond or  
 はそれぞれ単結合または Gly, Gly,Ala,Val,Arg,Asn,Ser,Phe,Pro,Leu,Glu,Asp,L  
 Ala、Val、Arg、Asn、Ser, ys,Thr,His,Tyr,Nle, and Ile, respectively, y  
 Phe、Pro、Leu、Glu、Asp, expresses a hydroxyl group or an amino group.)  
 Lys、Thr、His、Tyr、Nle It is attained by providing the peptide or its salt  
 および Ile よりなる群から選ば shown above.

れる 1 ～ 5 個のアミノ酸残基よ  
 りなるペプチド断片を表し、Y  
 は水酸基またはアミノ基を表  
 す) で示されるペプチドまたは  
 その塩を提供することによって  
 達成される。

## 【0006】

本明細書においては各種アミノ  
 酸残基を次の略号で記述する。

Ala : L-アラニン残基  
 Arg : L-アルギニン残基  
 Asn : L-アスパラギン残基  
 Asp : L-アスパラギン酸残基  
 Cys : L-システイン残基  
 Gln : L-グルタミン残基  
 Glu : L-グルタミン酸残基  
 Gly : グリシン残基  
 His : L-ヒスチジン残基

## [0006]

In this specification, the following symbol  
 describes various amino acid residues.

Ala :L- alanine residue  
 Arg :L- arginine residue  
 Asn :L- asparagine residue  
 Asp :L- aspartic-acid residue  
 Cys :L- cystein residue  
 Gln :L- glutamine residue  
 Glu :L- glutamic acid residue  
 Gly : glycine residue  
 His :L- histidine residue

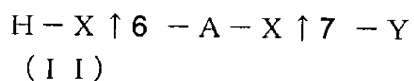
|                    |                               |
|--------------------|-------------------------------|
| Ile : L-イソロイシン残基   | Ile :L- isoleucine residue    |
| Leu : L-ロイシン残基     | Leu :L- leucine residue       |
| Lys : L-リシン残基      | Lys :L- lysine residue        |
| Phe : L-フェニルアラニン残基 | Phe :L- phenylalanine residue |
| Pro : L-プロリン残基     | Pro :L- proline residue       |
| Ser : L-セリン残基      | Ser :L- serine residue        |
| Thr : L-トレオニン残基    | Thr :L- threonine residue     |
| Trp : L-トリプトファン残基  | Trp : L-tryptophan residue    |
| Tyr : L-チロシン残基     | Tyr :L- tyrosine residue      |
| Val : L-バリン残基      | Val :L- valine residue        |
| Nle : L-ノルロイシン残基   | Nle :L- norleucine residue    |

また、本明細書においては、常法に従ってペプチドのアミノ酸配列を、そのN末端のアミノ酸残基が左側に位置し、C末端のアミノ酸残基が右側に位置するように記述する。

Moreover, in this specification, the amino acid residue of the N terminal is positioned in left-hand side in the amino acid sequence of a peptide according to a conventional method, the amino acid residue of a C terminal describes that it is positioned in right-hand side.

#### 【0007】

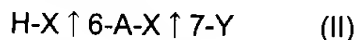
上記一般式 (I) で示されるペプチドのうち、下記一般式 (I)



(式中、Aは式(1):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 1) で示されるペプチド断片、式(2):Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号: 2) で示されるペプチド断片または式(3):Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu (配列番号: 3) で示されるペプチド断片を表し、X↑6 および X↑

#### [0007]

Following-general-formula (II) among the peptides shown with above-mentioned general formula (I)



(In the Formula, A is a peptide fragment shown by Formula (1):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (sequence number: 1), formula (2):The peptide fragment shown by Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (sequence number: 2)

Or Formula (3): The peptide fragment shown by Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu (sequence number: 3)

These are expressed, x↑6 and X↑7 express the peptide fragment which consists of a 1-5 amino acid residue chosen from the group



7 はそれぞれ単結合または Gly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Nle および Ile よりなる群から選ばれる 1～5 個のアミノ酸残基からなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表す) で示されるペプチドが好ましい。

which consists of a single bond or Gly,Ala,Val,Arg,Asn,Ser,Phe,Pro,Leu,Glu,Asp,Lys,Thr,His,Tyr,Nle, and Ile, respectively, y expresses a hydroxyl group or an amino group.) The peptide shown above is desirable.

**【0008】**

本発明により提供されるペプチドの代表例を次に示す。

式(4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 4)、

式(5): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 5)、

式(6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号: 6)、

式(7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 7)、

式(8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (配列番号: 8) および

式(9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (配列番号: 9)。

**[0008]**

The representative example of the peptide which this invention provides is shown next.

Formula (4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (sequence number: 4), formula (5): Ala Ala Pro Cys Cys Val

Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (sequence number: 5), formula (6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp

Leu Glu (sequence number: 6), formula (7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (sequence number: 7), formula

(8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (sequence number: 8)

And formula (9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (sequence number: 9).

**【0009】****[0009]**

本発明のペプチドの塩は生理学的に許容される塩であり、その塩としては、例えば、塩酸、硫酸、燐酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、オレイン酸、パルミチン酸などの酸との塩；ナトリウム、カリウム、カルシウム、アルミニウムなどのアルカリ金属またはアルカリ土類金属の水酸化物または炭酸塩との塩；トリエチルアミン、ベンジルアミン、ジエタノールアミン、*t*-ブチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、アルギニンなどとの塩などが挙げられる。

**【0010】**

本発明のペプチドは、ペプチドの合成において通常用いられる方法、例えば固相合成法または液相合成法によって調製されるが、固相合成法が操作上簡便である（例えば、日本生化学会編「続生化学実験講座 2 タンパク質の化学（下）」、第 641-694 頁（昭和 62 年 5 月 20 日 株式会社東京化学同人発行）参照）。

**【0011】**

本発明のペプチドの固相合成法による調製は、例えば、スチレンージビニルベンゼン共重合体などの反応溶媒に不溶性である

The salt of the peptide of this invention is a salt which it accepts physiologically.

As its salt, it is a salt with acids, such as the hydrochloric acid, a sulfuric acid, a phosphoric acid, lactic acid, tartaric acid, a maleic acid, a fumaric acid, an oxalic acid, malic acid, a citric acid, an oleic acid, and a palmitic acid, for example.;

The hydroxide of alkali metals, such as sodium, potassium, calcium, and aluminium, or alkaline-earth metal, or salt with the carbonate; A salt with a triethylamine, a benzylamine, a diethanolamine, a *tert* butylamine, a dicyclohexylamine, the arginine, etc. is mentioned.

**[0010]**

The peptide of this invention is prepared by the procedure usually used in a synthesis of a peptide, for example, a solid-phase synthesis method, and the liquid-phase synthesis method. However, a solid-phase synthesis method simply on operation comes out, and there is (for example, refer to the Japanese Biochemical Society edition "chemistry (below) of the sequal and biochemistry experiment seminar 2 protein", and Page 641-694 (May 20, Showa 62 K.K. Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. issue)).

**[0011]**

The manufacture by the solid-phase synthesis method of the peptide of this invention is combined with a polymer insoluble in reaction solvent, such as for example, a

重合体に目的とするペプチドのC末端に対応するアミノ酸をそれが有する $\alpha$ -COOH基を介して結合させ、次いで該アミノ酸に目的とするペプチドのN末端の方向に向かって、対応するアミノ酸またはペプチド断片を該アミノ酸またはペプチド断片が有する $\alpha$ -COOH基以外の $\alpha$ -アミノ基などの官能基を保護したうえで縮合させて結合させる操作と、該結合したアミノ酸またはペプチド断片における $\alpha$ -アミノ基などのペプチド結合を形成するアミノ基が有する保護基を除去する操作とを順次繰り返すことによってペプチド鎖を伸長させ、目的とするペプチドに対応するペプチド鎖を形成し、次いで該ペプチド鎖を重合体から脱離させ、かつ保護されている官能基から保護基を除去することにより目的とするペプチドを得、次いでこれを精製することによって実施される。ここで、ペプチド鎖の重合体からの脱離および保護基の除去は、フッ化水素を用いて同時に行うのが副反応を抑制する観点から好ましい。また、得られたペプチドの精製は逆相液体クロマトグラフィーで行うのが効果的である。

**【0012】**

また、本発明のペプチドの塩は、

styrene-divinylbenzene copolymer, through the (alpha)-COOH group on which it has an amino acid corresponding to the C terminal of the peptide made into the objective.

Subsequently, the operation which it is made to condense after protecting functional groups, such as (alpha)- amino groups other than the (alpha)-COOH group on which this amino acid or a peptide fragment has the amino acid or peptide fragment which goes and corresponds to this amino acid in the direction of N terminal of the peptide made into the objective, and is combined, a peptide chain is expanded by repeating in order operation of removing the protecting group which the amino group which forms a peptide bond of the (alpha)- amino group in this united amino acid or united peptide fragment etc. has.

The peptide chain corresponding to the target peptide is formed, subsequently, this peptide chain is desorbed from a polymer.

And the target peptide is obtained by removing a protecting group from the functional group protected, subsequently, it implements by purifying this.

Here, it is desirable to perform simultaneously elimination of the desorption and the protecting group from the polymer of a peptide chain using hydrogen fluoride from a viewpoint which suppresses a side reaction.

Moreover, it is effective to perform purification of the obtained peptide by the reversed phase liquid chromatography.

**[0012]**

Moreover, the salt of the peptide of this

通常の塩生成反応を利用することにより調製される。

invention is prepared by utilizing normal salt generation reaction.

**【 0 0 1 3 】**

後述の試験例から明らかなとおり、本発明のペプチドおよびその塩（以下、これらをペプチド類と略称する）は、TGF- $\beta$ 様活性を有し、かつ毒性試験において低毒性であることが確認されている。

**[0013]**

The peptide of this invention and its salt (these are hereafter called peptides roughly) have a TGF-(beta-) like activity a passage clear from the below-mentioned EXPERIMENT, and the low\_toxic thing is confirmed in the toxic examination.

**【 0 0 1 4 】**

以上の結果から、本発明のペプチド類は骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの治療に有用である。また、本発明のペプチド類は、臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制する。

**[0014]**

The peptides of the above result to this invention are useful for the treatment of fracture, a wound, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, multiple sclerosis, etc. Moreover, the peptides of this invention suppress the rejection after an organ transplant effectively.

**【 0 0 1 5 】**

本発明のペプチド類は、骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの患者に投与することにより、上記罹患者の症状を軽減することができる。

**[0015]**

The peptides of this invention can lighten the above-mentioned disease person's symptom by administering to patients, such as fracture, a wound, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, and multiple sclerosis.

**【 0 0 1 6 】**

ペプチド類の有効な活性発現のための投与量は、疾病、患者の重篤度、薬物に対する忍容性などにより異なるが、通常成人1日当たり、0.01  $\mu$ g/kg～

**[0016]**

The dosage for an effective active expression of peptides changes with the illness, a patient's seriousness, tolerances with respect to a medicine, etc.

However, they are normal adult 1 sunny and

2 g/kg であり、好ましくは 0.01 microgram/kg - 2 g/kg.  
 0.01  $\mu$ g/kg ~ 200 mg/kg Preferably it is 0.01 microgram(s)/kg - 200 mg/kg.  
 /kg である。

**【0017】**

投与形態としてはペプチド類を5%ブドウ糖液や生理食塩水などの生理学的に許容し得る溶液に溶解させて得られる溶液が好ましく、また該溶液は薬理学的に許容される種々の添加剤を含んでいてもよい。

**[0017]**

The solution obtained by dissolving peptides in solutions which can accept physiologically, such as 5-% glucose liquid and physiological saline, as an administration form is desirable, moreover, this solution may contain the various additive agent which it accepts pharmacologically.

**【0018】**

投与方法としては静脈投与、皮下投与、腹腔投与、関節内投与、経皮投与などが挙げられ、さらにペプチド類をカプセル化またはリポソーム化することにより経口投与も可能である。

**[0018]**

As the administration procedure, an intravenous administration, a subcutaneous administration, an abdominal-cavity administration, the administration in a joint, a percutaneous administration, etc. are mentioned, oral administration can also further do peptides capsulation or by liposome-izing.

**【0019】****[0019]****【実施例】**

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。なお、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

**[EXAMPLES]**

Hereafter, an Example demonstrates this invention concretely.  
 In addition, this invention is not limited by these Examples.

**【0020】****実施例 1**

式(4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala LeuGlu (配列番号: 4) で

**[0020]****Example 1**

Formula (4): The peptide shown by Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala LeuGlu (sequence number: 4) was

示されるペプチドをペプチド自動合成装置を用いて固相合成法により合成した。すなわち、4-〔N-(t-ブトキシカルボニル)-γ-ベンジル-L-グルタミルオキシメチル〕-フェニルアセトアミドメチル基を0.70ミリモル/g(樹脂)の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比:99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMグルタミン酸、t-Boc-L-Glu(OBzl)〕0.1ミリモルを用い、ペプチドのN端に向かって順次アミノ酸を結合させた。結合反応において、アミノ酸として、米国アプライド・バイオシステムズ社製のN↑α-(t-ブトキシカルボニル)-L-グルタミン〔t-Boc グルタミン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-ロイシン〔t-Boc ロイシン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-プロリン〔t-Boc プロリン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-グリシン〔t-Boc グリシン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-アスパラギン〔t-Boc アスパラギン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-O-ベンジル-L-セリン〔t-Boc セリン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-S-(p

compounded by the solid-phase synthesis method using the peptide automatic-synthesis apparatus.

That is, 0.1 millimoles of the grain-shape resin (USA Applied Biosystems make, PAM glutamic acid, t-Boc-L-Glu (OBzl)) which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which it has at a ratio of 0.70 millimoles (resin)/g are used, 4-(N-(t-butoxycarbonyl)-(gamma)-benzyl-L-glutamyl oxy methyl)-. The amino acid was combined for the phenyl acetamide methyl group in order toward N edge of a peptide.

For joint reaction, as an amino acid, the N↑(alpha)-(t-butoxycarbonyl)-L- glutamine by USA Applied Biosystems (t-Boc glutamine), a N-(t-butoxycarbonyl)-L- leucine (t-Boc leucine), a N-(t-butoxycarbonyl)-L- proline (t-Boc proline), a N-(t-butoxycarbonyl)-L- glycine (t-Boc glycine), N-(t-butoxycarbonyl)-L- asparagine (t-Boc asparagine), N-(t-butoxycarbonyl)-O-benzyl- L- serine (t-Boc serine), the N-(t-butoxycarbonyl)-S-(p- methoxy benzyl)-L- cystein (t-Boc cystein), the N-(t-butoxycarbonyl)-L- valine (t-Boc valine), and 1 millimole (t-Boc alanine) of N-(t-butoxycarbonyl)-L- alanines were used, respectively.

ーメトキシベンジル) ーLーシ  
 ス테인 [t-Boc シス테인]、  
 Nー(ーブトキシカルボニル)  
 ーLーバリン [t-Boc バリン]、  
 Nー(ーブトキシカルボニル)  
 ーLーアラニン [t-Boc アラニ  
 ン] をそれぞれ1ミリモル用い  
 た。

### 【0021】

得られたペプチドについて株式  
 会社ペプチド研究所製のHF反  
 応装置I型を用いて脱保護と固  
 相からの脱離を行った。粗生成  
 物をミリポア・ウォーターズ社  
 製分取用高速液体クロマトグラ  
 フ〔カラム：デルタパックC1  
 8 47×300mm プレップ  
 パック1000加圧モジュール  
 付〕で精製した。得られた精製  
 ペプチドを島津製作所株式会  
 社製LC6A分析用高速液体クロ  
 マトグラフ〔カラム：東ソー株  
 式会社製TSK gel ODS  
 ー80TM CTR、移動相：  
 トリフルオロ酢酸を0.05容  
 量%含有するアセトニトリルと  
 水の混合溶媒（アセトニトリル  
 濃度を30分間で5容量%から  
 50容量%に変化させた）〕に付  
 したところ、18.8minに単一  
 のピークが示された。FAB法  
 マススペクトルにより求めた精  
 製ペプチドの分子量は1527  
 であった（理論値：1527.  
 72）。

### [0021]

The desorption from de-protection and a  
 solid-phase was performed using the HF  
 reactor I type by Peptide Institute, Inc., K.K.,  
 about the obtained peptide.

The crude product was purified by the  
 high-speed liquid chromatograph for the  
 aliquoting made from the Millipore \* Waters Inc.  
 (column: with a delta pack C18 47\*300 mm prep  
 pack 1000 pressurization module).

About the obtained purification peptide, it is a  
 high-speed liquid chromatograph for the LC6AA  
 analysis by Shimadzu K.K. (column : attaching  
 to Tosoh Corp. TSKgel ODS-80TM CTR CTR).

Mobile phase: The single peak was shown by  
 18.8min when the trifluoroacetic acid was  
 attached to the mixed solvent (acetonitrile  
 density was changed from 5 volume % to 50  
 volume % in 30 minutes) of the acetonitrile  
 which contains 0.05 volume %, and water.

The molecular weight of the purification peptide  
 for which it required by the FAB method mass  
 spectrum was 1527 (theoretical value:  
 1527.72).

**【 0 0 2 2 】**

実施例 2 ～ 6 および比較例 1  
 式 (5): Ala Ala Pro Cys Cys Val  
 Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu  
 Pro IleVal (配列番号: 5) で  
 示されるペプチド (実施例 2)、  
 式 (6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala  
 Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln  
 Asp Leu Glu (配列番号: 6)  
 で示されるペプチド (実施例  
 3)、式 (7): Ala Ser Pro Cys  
 Cys Val Pro GlnAsp Leu Glu  
 Pro Leu Pro Ile Val (配列番  
 号: 7) で示されるペプチド (実  
 施例 4)、式 (8): Asn Pro Gly  
 Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys  
 Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro  
 Leu Thr Ile Leu (配列番号: 8)  
 で示されるペプチド (実施例  
 5)、式 (9): Asn Pro Gly Ala  
 Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val  
 Ser Gln AspLeu Glu Pro Leu  
 Pro Ile Leu (配列番号: 9) で  
 示されるペプチド (実施例 6)、  
 および式 (10): Gly Pro Cys  
 Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr  
 Gln Tyr Ser (配列番号: 10)  
 で示されるペプチド (比較例 1)  
 を実施例 1 と同様の方法により  
 合成した。

**[0022]**

Example 2-6 and Comparative Example 1  
 Formula (5): Peptide (Example 2) shown by Ala  
 Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro  
 Leu Pro IleVal (sequence number: 5), formula  
 (6): Peptide (Example 3) shown by Ala Pro Glu  
 Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp  
 Leu Glu (sequence number: 6), formula (7):  
 Peptide (Example 4) shown by Ala Ser Pro Cys  
 Cys Val Pro GlnAsp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val  
 (sequence number: 7), formula (8): Peptide  
 (Example 5) shown by Asn Pro Gly Ala Ser Ala  
 Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro  
 Leu Thr Ile Leu (sequence number: 8), formula  
 (9): Peptide (Example 6) shown by Asn Pro Gly  
 Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln  
 AspLeu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (sequence  
 number: 9), and formula (10): Peptide  
 (Comparative Example 1) shown by Gly Pro  
 Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser  
 was compounded by the procedure similar to  
 Example 1 (sequence number: 10).

**【 0 0 2 3 】**

実施例 2 および実施例 4 では 4  
 - [N-(t-ブトキシカルボ  
 ニル) - L-バリルオキシメチ

**[0023]**

In Example 2 and Example 4, it is 4.  
 -(N-(t-butoxycarbonyl)-L- valyl oxy methyl)- 0.1  
 millimoles (USA Applied Biosystems make,



ル]ーフェニルアセトアミドメチル基を0.68ミリモル/g (樹脂)の割合で有するスチレンージビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比:99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMバリン、t-Boc-L-Val〕0.1ミリモルを用い、実施例3では4ー〔Nー(tーブトキシカルボニル)ーγーベンジルーLーグルタミルオキシメチル〕ーフェニルアセトアミドメチル基を0.70ミリモル/g (樹脂)の割合で有するスチレンージビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比:99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMグルタミン酸、t-Boc-L-Glu(OBzl)〕0.1ミリモルを用い、実施例5及び実施例6では4ー〔Nー(tーブトキシカルボニル)ーLーロイシルオキシメチル〕ーフェニルアセトアミドメチル基を0.68ミリモル/g (樹脂)の割合で有するスチレンージビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比:99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMロイシン、t-Boc-L-Leu〕0.1ミリモルを用い、比較例1では4ー

PAM valine, t-Boc-L-Val) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group at a ratio of 0.68 millimoles (resin)/g are used, in Example 3, it is 4. -(N-(t-butoxycarbonyl)-(gamma)- benzyl- L- glutamyl oxy methyl)- 0.1 millimoles (USA Applied Biosystems make, PAM glutamic acid, t-Boc-L-Glu (OBzl)) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group at a ratio of 0.70 millimoles (resin)/g are used, in Example 5 and Example 6, it is 4. -(N-(t-butoxycarbonyl)-L-leucyl oxy methyl)- 0.1 millimoles (USA Applied Biosystems make, a PAM leucine, t-Boc-L-Leu) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group at a ratio of 0.68 millimoles (resin)/g are used, in Comparative Example 1, it is 4. -(N-(t-butoxycarbonyl)-O- benzyl- L- seril oxy methyl)- 0.1 millimoles (USA Applied Biosystems make, PAM serine, t-Boc-L-Ser (Bzl)) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group at a ratio of 0.72 millimoles (resin)/g were used.

〔N-（t-ブトキシカルボニル）-O-ベンジル-L-セリルオキシメチル〕-フェニルアセトアミドメチル基を0.72ミリモル/g（樹脂）の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比：99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMセリン、t-Boc-L-Ser(Bzl)〕0.1ミリモルを用いた。

#### 【0024】

また、アミノ酸としては、実施例1で用いたものに加えて米国アプライド・バイオシステムズ社製のN-（t-ブトキシカルボニル）-O-（2-ブロモベンジルオキシカルボニル）-L-チロシン〔t-Boc チロシン〕、N-（t-ブトキシカルボニル）-L-イソロイシン〔t-Boc イソロイシン〕、N-（t-ブトキシカルボニル）-γ-ベンジル-L-グルタミン酸〔t-Boc グルタミン酸〕、N-（t-ブトキシカルボニル）-β-ベンジル-L-アスパラギン酸〔t-Boc アスパラギン酸〕、N↑α-（t-ブトキシカルボニル）-NInd-ホルミル-L-トリプトファン〔t-Boc トリプトファン〕を用いた。

#### 【0024】

As an amino acid, it adds to what was used in Example 1. Moreover, the N-(t-butoxycarbonyl)-O-(2-bromobenzyloxycarbonyl)-L-tyrosine by USA Applied Biosystems (t-Boc tyrosine), the N-(t-butoxycarbonyl)-L-isoleucine (t-Boc isoleucine), n-(t-butoxycarbonyl)-(gamma)-benzyl-L-glutamic acid (t-Boc glutamic acid), N-(t-butoxycarbonyl)-(beta)-benzyl-L-aspartic acid (t-Boc aspartic acid), n↑(alpha)-(t-butoxycarbonyl)-NInd-formyl-L-tryptophan (t-Boc tryptophan) were used.

## 【0025】

得られたそれぞれのペプチドについて実施例1におけると同様にして脱保護と固相からの脱離を行い、粗生成物を精製した。それぞれの精製ペプチドについて、分析用高速液体クロマトグラフにおける溶出時間およびFAB法マスペクトルによる分子量測定結果を第1表にまとめて示す。

## [0025]

In Example 1, the desorption from de-protection and a solid-phase was similarly performed about each obtained peptide, and the crude product was purified. About each purification peptide, the elution time in the high-speed liquid chromatograph for an analysis and the determination-of-molecular-weight result by the FAB method mass spectrum are summarized in Table 1, and are shown.

## 【0026】

## [0026]

## 【表1】

## [TABLE 1]

第 1 表

| 実施例<br>または<br>比較例 | 溶出時間<br>(min) | 精製ペプチド |      | (理論値)   |
|-------------------|---------------|--------|------|---------|
|                   |               | 式番号    | 分子量  |         |
| 実施例2              | 23.9          | (5)    | 1620 | 1620.97 |
| 実施例3              | 18.0          | (6)    | 1658 | 1659.79 |
| 実施例4              | 23.8          | (7)    | 1680 | 1680.98 |
| 実施例5              | 25.5          | (8)    | 2112 | 2115.38 |
| 実施例6              | 25.0          | (9)    | 2111 | 2111.39 |
| 比較例1              | 23.4          | (10)   | 1631 | 1629.78 |

First Table

Example or Comparative Example; Elution time; Purification Peptide (Formula number; Molecular weight); (Theoretical value)

## Example 2

...

## Comparative Example 1

## 【0027】

## 試験例 1

コンカナバリンA刺激マウス脾臓細胞の増殖抑制試験

BALB/cマウス脾臓細胞を、コンカナバリンA:  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、2-メルカプトエタノール:  $50 \mu\text{M}$ 、牛胎児血清: 13%の割合でそれぞれ含有するRPMI-1640培地に分散し、5000個/ウエルの割合で96ウエルプレートに分注し、7%CO<sub>2</sub>存在下37℃で7日間培養した。培養後プロピディウムアイオダイドで生細胞のDNAを標識し、蛍光強度を測定することにより生細胞数をカウントした。ペプチドは $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、TGF- $\beta$ は $1 \text{ ng}/\text{ml}$ の濃度になるようにそれぞれコンカナバリンA刺激直前に添加した。コンカナバリンAを加えないウエルに対するコンカナバリンAのみを加えたウエルの生細胞数の増加を1として、ペプチドまたはTGF- $\beta$ を加えた時の生細胞数の減少を抑制率として表した。結果を第2表に示す。

## [0027]

## Experiment 1

The growth-inhibition examination of the A-concanavalin-A irritation mouse spleen cell

The BALB/c-mouse spleen cell is dispersed to RPMI-1640 medium which contains at A-concanavalin-A:3 microgram/ml, 2-mercaptoethanol:50 micronM, and a foetal-bovine-serum:13% ratio, respectively, it dispenses on 96 well plate at a ratio of 5000 piece / well, 7% CO<sub>2</sub> -- it cultivated for seven days at 37 degrees C in presence.

DNA of a living cell is labeled with propidium iodide after cultivating, the living cell number was counted by measuring a fluorescence intensity.

The peptide added 100 microgram(s)/ml and TGF- (beta-) just before the A-concanavalin-A irritation, respectively so that it might become the density of 1 ng/ml.

The increase in the living cell number of the well which added only the A concanavalin A with respect to the well which does not add the A concanavalin A is set to 1, the reduction of the living cell number when adding a peptide or TGF- (beta-) was expressed as a suppression rate.

A result is shown in Table 2.

## 【0028】

## [0028]

【表 2】

[TABLE 2]

第 2 表

| 実施例または<br>比較例 | ペ プ チ ド          | 抑制率 (%) |
|---------------|------------------|---------|
| —             | T G F - $\beta$  | 8 5     |
| 実施例 1         | 式 (4) で表されるペプチド  | 6 0     |
| 実施例 2         | 式 (5) で表されるペプチド  | 7 0     |
| 実施例 3         | 式 (6) で表されるペプチド  | 6 5     |
| 実施例 4         | 式 (7) で表されるペプチド  | 7 3     |
| 実施例 5         | 式 (8) で表されるペプチド  | 7 0     |
| 実施例 6         | 式 (9) で表されるペプチド  | 7 2     |
| 比較例 1         | 式 (10) で表されるペプチド | 2       |

Second Table

Example or Comparative Example; Peptide; Suppression rate

Example 1; Peptide expressed with formula (4)

...

Comparative Example 1; ...

【0029】

第2表のとおり、T G F -  $\beta$  の抑制率が85%であるのに対し、実施例1～実施例6で得られたペプチドの抑制率は60%～73%であり、本発明のペプ

[0029]

As opposed to the suppression rate of TGF-(beta-) being 85 % as Table 2, the suppression rate of the peptide obtained in Example 1-Example 6 is 60 % - 73 %.

It is clear that the peptide of this invention

チドがTGF- $\beta$ 様の活性を示すことは明らかである。 shows TGF-(beta) -like activity.

**【0030】****試験例2****軟寒天中のコロニー形成試験**

2.5 ng/ml のEGF、10%の牛胎児血清及び0.5%の寒天を含むイーグルのMEM培地にNRK-49F細胞を1000個/シャーレの割合で直径10 cmのシャーレに撒き、7%CO<sub>2</sub>存在下37℃で7日間培養した。ニュートラルレッドで生細胞を染色し、コロニー100個あたりの70  $\mu$ m以上の直径を有するコロニーの割合を求めた。その結果、実施例1で得られたペプチドを300  $\mu$ g/mlの濃度で添加したときに平均58%のコロニーが形成され、何も添加しないコントロールの平均33%と比較して有意にコロニー形成が促進された。

**[0030]****Experiment 2**

The colony formation examination in soft agar NRK-49F cell is scattered at a ratio of 1000 piece / Petri dish at a Petri dish with a diameter of 10 cm to the MEM medium of the eagle containing 2.5-ng/ml EGF, 10% of foetal bovine serum, and 0.5% of agar, in presence of 7% CO<sub>2</sub>, it cultivated for seven days at 37 degrees C.

A living cell is colored by the neutral red, the ratio of a colony of having the diameter of 70 micrometer or more per 100 colonies was searched for.

Consequently, when the peptide obtained in Example 1 is added by 300 microgram(s)/ml density, an average of 58% of colony is formed, compared with an average of 33% of the control which nothing adds, colony formation was promoted significantly.

**【0031】****【発明の効果】**

本発明により提供されるペプチド類は、骨折、創傷、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病などの治療に有効であり、また臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制することができる。

**[0031]****[ADVANTAGE of the Invention]**

The peptides which this invention provides are effective in the treatment of fracture, a wound, multiple sclerosis, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, etc.

Moreover, the rejection after an organ transplant can be suppressed effectively.

【 0 0 3 2 】

[0032]

## 【配列表】

配列番号 : 1  
配列の長さ : 1 1  
配列の型 : アミノ酸  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : ペプチド

## [SEQUENCE TABLE]

Sequence number: 1  
Sequence length: 11  
Sequence type: Amino acid  
Topology: Linear  
Type of sequence: Peptide

## 配列

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu  
1                      5                      10

Sequence

【 0 0 3 3 】

[0033]

配列番号 : 2  
配列の長さ : 1 1  
配列の型 : アミノ酸  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : ペプチド

Sequence number: 2  
Sequence length: 11  
Sequence type: Amino acid  
Topology: Linear  
Type of sequence: Peptide

## 配列

Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu  
1                      5                      10

Sequence

【 0 0 3 4 】

[0034]

配列番号 : 3  
配列の長さ : 1 1  
配列の型 : アミノ酸  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : ペプチド

Sequence number: 3  
Sequence length: 11  
Sequence type: Amino acid  
Topology: Linear  
Type of sequence: Peptide

**配列**

Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu  
 1 5 10

## Sequence

**【0035】**

配列番号：4  
 配列の長さ：16  
 配列の型：アミノ酸  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：ペプチド  
 配列

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro  
 Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu  
 Glu  
 1 5 10  
 15

**[0035]**

Sequence number: 4  
 Sequence length: 16  
 Sequence type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Type of sequence: Peptide  
 Sequence

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val  
 Pro Gln Ala Leu Glu  
 1 5 10  
 15

**【0036】**

配列番号：5  
 配列の長さ：16  
 配列の型：アミノ酸  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：ペプチド  
 配列

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
 Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile  
 Val  
 1 5 10  
 15

**[0036]**

Sequence number: 5  
 Sequence length: 16  
 Sequence type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Type of sequence: Peptide  
 Sequence

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu  
 Pro Leu Pro Ile Val  
 1 5 10  
 15

**【0037】**

配列番号：6  
 配列の長さ：16

**[0037]**

Sequence number: 6  
 Sequence length: 16



配列の型：アミノ酸  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：ペプチド  
 配列

Sequence type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Type of sequence: Peptide  
 Sequence

Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val  
 Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu  
 Glu 1 5 10  
 1 5 15  
 10 15

【0038】

配列番号：7  
 配列の長さ：16  
 配列の型：アミノ酸  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：ペプチド  
 配列

[0038]

Sequence number: 7  
 Sequence length: 16  
 Sequence type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Type of sequence: Peptide  
 Sequence

Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu  
 Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val  
 Ile Val 1 5 10  
 1 5 15  
 10 15

【0039】

配列番号：8  
 配列の長さ：21  
 配列の型：アミノ酸  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：ペプチド  
 配列

[0039]

Sequence number: 8  
 Sequence length: 21  
 Sequence type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Type of sequence: Peptide  
 Sequence

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val  
 Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Ser Gln Asp Leu Glu  
 Glu 1 5 10  
 1 5 15  
 10 15  
 Pro Leu Thr Ile Leu 20

20

**【 0 0 4 0 】**

配列番号 : 9

配列の長さ : 2 1

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro

Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu

Glu

1

10

Pro Leu Pro Ile Leu

20

**[0040]**

Sequence number: 9

Sequence length: 21

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

Type of sequence: Peptide

Sequence

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val

Ser Gln Asp Leu Glu

1

5

10

15

Pro Leu Pro Ile Leu

20

**【 0 0 4 1 】**

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 1 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser

Leu Asp Thr Gln Tyr Ser

1

5

10

**[0041]**

Sequence number: 10

Sequence length: 14

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

Type of sequence: Peptide

Sequence

Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln

Tyr Ser

1

5

10



## DERWENT TERMS AND CONDITIONS

*Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)

09/421,545

JP6-25288-A



**MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**

|  |   |
|--|---|
| <b>(19) 【発行国】</b><br>日本国特許庁 ( J P )  | <b>(19)[ISSUING COUNTRY]</b><br>Japan Patent Office (JP)  |
| <b>(12) 【公報種別】</b><br>公開特許公報 ( A )   | <b>(12)[GAZETTE CATEGORY]</b><br>Laid-open Kokai Patent (A)   |
| <b>(11) 【公開番号】</b><br>特開平 6 - 2 5 2 8 8  | <b>(11)[KOKAI NUMBER]</b><br>Unexamined Japanese Patent (1994-25288)<br>Heisei 6-25288  |
| <b>(43) 【公開日】</b><br>平成 6 年 ( 1 9 9 4 ) 2 月 1 日  | <b>(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION]</b><br>(1994.2.1)  |
| <b>(54) 【発明の名称】</b><br>ペプチドまたはその塩  | <b>(54)[TITLE of the Invention]</b><br>PEPTIDE OR ITS SALT  |
| <b>(51) 【国際特許分類第 5 版】</b><br>C07K 7/08<br>7537-4H<br>7/06<br>8318-4H<br>7/10<br>7537-4H<br>// A61K 37/02<br>ABG<br>ABJ<br>ACK<br>ADA<br>8314-4C<br>ADF<br>C07K 99:00 | <b>(51)[IPC Int. Cl. 5]</b><br>ZNA C07K 7/08 ZNA 7537-4H<br>7/06 Z 8318-4H<br>Z 7/10 7537-4H<br>// A61K 37/02 ABG<br>ABJ<br>ACK<br>ADA 8314-4C<br>ADF<br>C07K 99:00 |
| <b>【審査請求】</b> 未請求  | <b>[REQUEST FOR EXAMINATION]</b> No   |

【請求項の数】 3

[NUMBER OF CLAIMS] 3

【全頁数】 9

[NUMBER OF PAGES] 9

(21) 【出願番号】

特願平4-207501

(21)[APPLICATION NUMBER]

Japanese Patent Application (1992-207501)

Heisei 4-207501

(22) 【出願日】

平成4年(1992)7月10

日

(22)[DATE OF FILING]

(1992.7.10)

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

000001085

[ID CODE]

000001085

【氏名又は名称】

株式会社クラレ

[NAME OR APPELLATION]

Kuraray Co., Ltd.

【住所又は居所】

岡山県倉敷市酒津1621番地

[ADDRESS or DOMICILE]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

谷原 正夫

[NAME OR APPELLATION]

Tanihara Masao

【住所又は居所】

岡山県倉敷市酒津2045番地

の1 株式会社クラレ内

[ADDRESS or DOMICILE]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

## 【氏名】

藤原 千絵

## [NAME OR APPELLATION]

Fujiwara Chie

## 【住所又は居所】

岡山県倉敷市酒津 2 0 4 5 番地  
の 1 株式会社クラレ内

## [ADDRESS or DOMICILE]

## (57) 【要約】

## (57)[ABSTRACT of the Disclosure]

## 【構成】

下記の一般式

$$\begin{array}{l} \text{H}-\text{X}\uparrow 1-\text{Ala}-\text{X}\uparrow 2-\text{Pro} \\ -\text{Cys}-\text{Cys}-\text{Val}-\text{X}\uparrow 3-\text{Gln} \\ -\text{X}\uparrow 4-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{X}\uparrow 5- \\ \text{Y} \end{array}$$

(式中、X↑2 は Ser および Ala よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑3 は Ser および Pro よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑4 は Ala および Asp よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑1 および X↑5 はそれぞれ単結合または Gly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Nle および Ile よりなる群から選ばれる 1～5 個のアミノ酸残基よりなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表す) で示され、かつ TGF-β 様活性を有するペプチドまたは

## [CONSTITUTION]

The following general formula

$$\text{H}-\text{X}\uparrow 1-\text{Ala}-\text{X}\uparrow 2-\text{Pro}-\text{Cys}-\text{Cys}-\text{Val}-\text{X}\uparrow 3-\text{Gln}-\text{X}\uparrow 4-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{X}\uparrow 5-\text{Y}$$

(X↑2, expressing the amino acid residue chosen from the group which is made of Ser and Ala in the Formula.

X↑3 expresses the amino acid residue chosen from the group which is made of Ser and Pro, x↑4 expresses the amino acid residue chosen from the group which is made of Ala and Asp, x↑1 and X↑5 express the peptide fragment which is made of a 1-5 amino acid residue chosen from the group which is made of a single bond or Gly,Ala,Val,Arg,Asn,Ser,Phe,Pro,Leu,Glu,Asp,Lys,Thr,His,Tyr,Nle, and Ile, respectively, y expresses a hydroxyl group or an amino group.) It shows above, and the peptide or its salt which has a TGF-(beta-) like activity.

その塩。

**【効果】**

骨折、創傷、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病などの治療に有用であり、また臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制する。

**[ADVANTAGE]**

It is useful for the treatment of fracture, a wound, multiple sclerosis, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, etc.

Moreover, the rejection after an organ transplant is suppressed effectively.

**【特許請求の範囲】**

**[CLAIMS]**

**【請求項 1】**

一般式

H-X ↑ 1-Ala-X ↑ 2-Pro  
-Cys-Cys-Val-X ↑ 3-Gln  
-X ↑ 4-Leu-Glu-X ↑ 5-Y

(式中、X ↑ 2 は Ser および Ala よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X ↑ 3 は Ser および Pro よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X ↑ 4 は Ala および Asp よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X ↑ 1 および X ↑ 5 はそれぞれ単結合または Gly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Nle および Ile よりなる群から選ばれる 1～5 個のアミノ酸残基よりなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表す。) で示され、かつ TGF-β

**[CLAIM 1]**

General formula

H-X ↑ 1-Ala-X ↑ 2-Pro-Cys-Cys-Val-X ↑ 3-Gln-X  
↑ 4-Leu-Glu-X ↑ 5-Y

(X ↑ 2, expressing the amino acid residue chosen from the group which is made of Ser and Ala in the Formula, x ↑ 3 expresses the amino acid residue chosen from the group which is made of Ser and Pro, x ↑ 4 expresses the amino acid residue chosen from the group which is made of Ala and Asp, x ↑ 1 and X ↑ 5 express the peptide fragment which is made of a 1-5 amino acid residue chosen from the group which is made of a single bond or Gly,Ala,Val,Arg,Asn,Ser,Phe,Pro,Leu,Glu,Asp,Lys,Thr,His,Tyr,Nle, and Ile, respectively, y expresses a hydroxyl group or an amino group.) It shows above, and the peptide or its salt which has a TGF-(beta-) like activity.

様活性を有するペプチドまたはその塩。

**【請求項 2】**

一般式



(式中、Aは式(1):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 1)で示されるペプチド断片、式(2):Ala Ser Pro Cys Cys Val ProGln Asp Leu Glu (配列番号: 2)で示されるペプチド断片または式(3):Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu (配列番号: 3)で示されるペプチド断片を表し、X↑6 およびX↑7 はそれぞれ単結合またはGly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Nle およびIle よりなる群から選ばれる1～5個のアミノ酸残基からなるペプチド断片を表し、Yは水酸基またはアミノ基を表す。)で示される請求項1記載のペプチドまたはその塩。

**[CLAIM 2]**

General formula



(In the Formula, A is a peptide fragment shown by Formula (1):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (sequence number: 1), formula (2): The peptide fragment shown by Ala Ser Pro Cys Cys Val ProGln Asp Leu Glu (sequence number: 2)

Or Formula (3): Expressing the peptide fragment shown by Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu (sequence number: 3), x↑6 and X↑7 express the peptide fragment which is made of a 1-5 amino acid residue chosen from the group which is made of a single bond or Gly,Ala,Val,Arg,Asn,Ser,Phe,Pro,Leu,Glu,Asp,Lys,Thr,His,Tyr,Nle, and Ile, respectively, y expresses a hydroxyl group or an amino group. )

The peptide or its salt of Claim 1 shown now.

**【請求項 3】**

下記の

式(4):Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 4)、式(5):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 5)、

**[CLAIM 3]**

Following

Formula (4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (sequence number: 4), formula (5): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (sequence number: 5), formula (6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp



式(6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Leu Glu (sequence number: 6), formula (7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Asp Leu Glu (配列番号: 6)、Leu Pro Ile Val (sequence number: 7), formula (7): Ala Ser Pro Cys Cys (8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Leu Pro Ile Val (配列番号: 7)、(sequence number: 8)  
 式(8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Or formula (9): The peptide or its salt of Claim 1 Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln shown by Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (配列番号: 8) または Leu (sequence number: 9).  
 式(9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (配列番号: 9)  
 で示される請求項1記載のペプチドまたはその塩。

**【発明の詳細な説明】****[DETAILED DESCRIPTION of the INVENTION]****【0001】****[0001]****【産業上の利用分野】****[INDUSTRIAL APPLICATION]**

本発明はTGF- $\beta$ 様活性を有するペプチドまたはその塩に関する。本発明により提供されるペプチドまたはその塩は、TGF- $\beta$ 様活性を有することから、骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの治療に有用であり、また臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制することができる。

This invention relates to the peptide or its salt which has a TGF-(beta-) like activity. Since the peptide or its salt which this invention provides has a TGF-(beta-) like activity, it is useful for the treatment of fracture, a wound, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, multiple sclerosis, etc. Moreover, the rejection after an organ transplant can be suppressed effectively.

【0002】

[0002]

## 【従来の技術】

TGF (トランスフォーミング  
グロウス ファクター  
transforming growth factor) -  
β は、非腫瘍細胞に腫瘍細胞的  
性質を発現させる腫瘍由来因子  
として発見され、その後、血小  
板、マクロファージ、骨、腎臓  
などの正常組織にも発見された  
(臨床免疫、第 24 巻、第 146  
頁 (1992 年)参照)。活性型の T  
GF-β は分子量が約 25 kD  
のホモダイマーとして存在し  
(プロシーディングス オブ  
ザ ナショナル アカデミー  
オブ サイエンス オブ ザ  
ユナイテッド ステイツ オブ  
アメリカ (Proc. Natl. Acad.  
Sci.USA.)), 第 85 巻、第 4715  
頁 (1988 年)参照)、ラットの正  
常線維芽細胞である NRK-4  
9F 株に対して可逆的に形質転  
換を引き起こし、軟寒天培地で  
の増殖を促進する作用を有する  
が、その他多くの細胞に対して  
は増殖抑制因子として作用する  
ことが明らかになっている (カ  
レント トピックス イン デ  
イベロップメンタル バイオロ  
ジー (Current Topics in  
Developmental Biology)、第 24  
巻、第 95 頁 (1990 年)参照)。

## [PRIOR ART]

TGF(transforming growth factor  
transforming growth factor)- (beta-) is  
discovered as a tumor origin factor which  
makes the non-oncocyte express an  
oncocyte-characteristic, after that, normal  
tissues, such as blood platelets, macrophage, a  
bone, and a kidney, also discovered (refer to a  
clinical immunology, Volume 24, and Page 146  
(1992)).

As for activated TGF- (beta-), molecular weight  
exists as a homo dimer of about 25 kD(s).

(Proceedings of the National Academy of the  
Sciences of the United States of America  
(Proc.Natl.Acad.Sci.USA.).)

It causes transforming reversibly to NRK-49F  
strain which is the normal fibroblast of Volume  
85, refer Page 4715 (1988), and a rat, it has the  
effect which promotes propagation by the soft  
agar.

However, it becomes clearly to act as a  
growth-inhibition factor to many cell in addition  
to this (refer Current Topics in Developmental  
Biology (Current Topics in Developmental  
Biology), Volume 24, and Page 95 (1990)).

## 【0003】

TGF- $\beta$ は血管の新生を促進し、かつ細胞外基質蛋白質の合成を促進することから、骨折の接合作用または創傷治癒効果を有すると考えられる (サイエンス(Science)、第 237 巻、第 1333 頁 (1987 年)参照)。また、TGF- $\beta$ は強力な免疫抑制作用をもつことから、臓器移植後の拒絶反応を抑制することが報告されている (プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.))、第 87 巻、第 1591 頁 (1990 年)参照)。さらに、TGF- $\beta$ はリウマチ性関節炎の患者の関節液中に存在し、強力な炎症性メディエータである IL-1 の作用を中和することが報告されている (ザ ジャーナル オブ イムノロジー (J. Immunol.))、第 145 巻、第 2514 頁 (1990 年)参照)。また、TGF- $\beta$ は in vivo で骨形成を促進することから、骨粗鬆症または歯周炎の治療に有用であると考えられ (実験医学、第 8 巻、第 345 頁 (1990 年)参照)、実験的多発性硬化症モデル動物の発症を抑制することも報告されている (プロシーディングス オブ ザ ナショナル

## [0003]

TGF- (beta-) promotes neogenesis of the blood vessel, and since a synthesis of an extra-cellular substrate protein is promoted, it is thought that it has a joining effect of fracture or the wound healing effect (refer a science (Science), Volume 237, and Page 1333 (1987)). Moreover, since TGF- (beta-) has a forceful immunosuppressive effect, suppressing the rejection after an organ transplant is reported (refer to the Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.), Volume 87, and Page 1591 (1990)).

Furthermore, TGF- (beta-) exists in the synovial fluid of the patient of a rheumatic arthritis, neutralizing an effect of IL-1 which is a forceful inflammatory mediator is reported (refer to the Journal of Immunology (J. Immunol.), Volume 145, and Page 2514 (1990)).

Moreover, TGF- (beta-) from promoting an osteogenesis in-vivo

It is thought that it is useful for the treatment of osteoporosis or the periodontitis (refer to the experimental medicine, Volume 8, and Page 345 (1990)), suppressing onset of an experimental multiple sclerosis model animal is also reported (it Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.)).

Refer to Volume 88 and Page 2918 (1991).

アカデミー オブ サイエンス  
 ーズ オブザ ユナイテッド  
 ステイツ オブ アメリカ  
 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)、  
 第 88 巻、第 2918 頁 (1991 年)  
 参照)。

【0004】

[0004]

【発明が解決しようとする課題】

上記の TGF- $\beta$  は、分子量が大きいことから免疫原性が高く、反復投与によりアナフィラキシーショックを引き起こす虞れがある。また生体内に投与しても数分内に血中から消失し、有効性が失われる。また大量に投与することにより、肝臓および腎臓に対する毒性、非特異的な免疫抑制などの種々の副作用が発現する可能性がある。しかるに、本発明の目的は、TGF- $\beta$  よりも副作用が少なく、かつ強い TGF- $\beta$  様活性を有するペプチドを提供することにある。

**[PROBLEM to be solved by the Invention]**

Since molecular weight is large, above-mentioned TGF- (beta-) has a high immunogenicity, and has a possibility that a repetitive administration may cause the anaphylactic shock.

Moreover, even if it administers in the living body, a blood shell loss is carried out within several minutes, and effectiveness is lost.

Moreover, by administering in large quantities, various side effects, such as a toxicity with respect to a liver and a kidney and non-specific immunosuppression, may express.

However, objective of the invention is to provide the peptide which has a strong TGF-(beta-) like activity with few side effects rather than TGF-(beta-).

【0005】

[0005]

【課題を解決するための手段】

本発明によれば、上記の目的は、下記的一般式 (I)



**[MEANS to solve the Problem]**

According to this invention, the above-mentioned objective, the following general formula (I)

Pro — Cys — Cys — Val — X H-X ↑ 1-Ala-X ↑ 2-Pro-Cys-Cys-Val-X ↑ 3-Gln-X  
 ↑ 3 — Gln — X ↑ 4 ↑ 4-Leu-Glu-X ↑ 5-Y (I)

— Leu — Glu — X ↑ 5 — Y (In the Formula, X ↑ 2 expresses the amino acid  
 (I) residue chosen from the group which consists

(式中、X ↑ 2 は Ser および of Ser and Ala, x ↑ 3 expresses the amino acid  
 Ala よりなる群から選ばれるア residue chosen from the group which consists  
 ミノ酸残基を表し、X ↑ 3 は of Ser and Pro, x ↑ 4 expresses the amino acid  
 Ser および Pro よりなる群から residue chosen from the group which consists  
 選ばれるアミノ酸残基を表し、 of Ala and Asp, x ↑ 1 and X ↑ 5 express the  
 X ↑ 4 は Ala および Asp より peptide fragment which consists of a 1-5 amino  
 なる群から選ばれるアミノ酸残 acid residue chosen from the group which  
 基を表し、X ↑ 1 および X ↑ 5 consists of a single bond or  
 はそれぞれ単結合または Gly, Gly,Ala,Val,Arg,Asn,Ser,Phe,Pro,Leu,Glu,Asp,L  
 Ala、Val、Arg、Asn、Ser, ys,Thr,His,Tyr,Nle, and Ile, respectively, y  
 Phe、Pro、Leu、Glu、Asp, expresses a hydroxyl group or an amino group.)  
 Lys、Thr、His、Tyr、Nle It is attained by providing the peptide or its salt  
 および Ile よりなる群から選ば shown above.  
 れる 1～5 個のアミノ酸残基よ  
 りなるペプチド断片を表し、Y  
 は水酸基またはアミノ基を表  
 す) で示されるペプチドまたは  
 その塩を提供することによって  
 達成される。

#### 【0006】

本明細書においては各種アミノ酸残基を次の略号で記述する。

Ala : L-アラニン残基  
 Arg : L-アルギニン残基  
 Asn : L-アスパラギン残基  
 Asp : L-アスパラギン酸残基  
 Cys : L-システイン残基  
 Gln : L-グルタミン残基  
 Glu : L-グルタミン酸残基  
 Gly : グリシン残基  
 His : L-ヒスチジン残基

#### [0006]

In this specification, the following symbol describes various amino acid residues.

Ala :L- alanine residue  
 Arg :L- arginine residue  
 Asn :L- asparagine residue  
 Asp :L- aspartic-acid residue  
 Cys :L- cystein residue  
 Gln :L- glutamine residue  
 Glu :L- glutamic acid residue  
 Gly : glycine residue  
 His :L- histidine residue

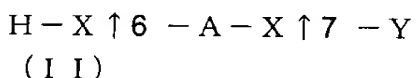
|                    |                               |
|--------------------|-------------------------------|
| Ile : L-イソロイシン残基   | Ile :L- isoleucine residue    |
| Leu : L-ロイシン残基     | Leu :L- leucine residue       |
| Lys : L-リシン残基      | Lys :L- lysine residue        |
| Phe : L-フェニルアラニン残基 | Phe :L- phenylalanine residue |
| Pro : L-プロリン残基     | Pro :L- proline residue       |
| Ser : L-セリン残基      | Ser :L- serine residue        |
| Thr : L-トレオニン残基    | Thr :L- threonine residue     |
| Trp : L-トリプトファン残基  | Trp :L-tryptophan residue     |
| Tyr : L-チロシン残基     | Tyr :L- tyrosine residue      |
| Val : L-バリン残基      | Val :L- valine residue        |
| Nle : L-ノルロイシン残基   | Nle :L- norleucine residue    |

また、本明細書においては、常法に従ってペプチドのアミノ酸配列を、そのN末端のアミノ酸残基が左側に位置し、C末端のアミノ酸残基が右側に位置するように記述する。

Moreover, in this specification, the amino acid residue of the N terminal is positioned in left-hand side in the amino acid sequence of a peptide according to a conventional method, the amino acid residue of a C terminal describes that it is positioned in right-hand side.

### 【0007】

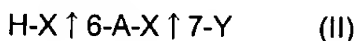
上記一般式 (I) で示されるペプチドのうち、下記一般式 (I I)



(式中、Aは式(1):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 1) で示されるペプチド断片、式(2):Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号: 2) で示されるペプチド断片または式(3):Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu (配列番号: 3) で示されるペプチド断片を表し、X↑6 および X↑

### [0007]

Following-general-formula (II) among the peptides shown with above-mentioned general formula (I)



(In the Formula, A is a peptide fragment shown by Formula (1):Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (sequence number: 1), formula (2): The peptide fragment shown by Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (sequence number: 2)

Or Formula (3): The peptide fragment shown by Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu (sequence number: 3)

These are expressed, x↑6 and X↑7 express the peptide fragment which consists of a 1-5 amino acid residue chosen from the group

7 はそれぞれ単結合または Gly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、Nle および Ile よりなる群から選ばれる 1～5 個のアミノ酸残基からなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表す) で示されるペプチドが好ましい。

which consists of a single bond or Gly,Ala,Val,Arg,Asn,Ser,Phe,Pro,Leu,Glu,Asp,Lys,Thr,His,Tyr,Nle, and Ile, respectively, y expresses a hydroxyl group or an amino group.) The peptide shown above is desirable.

## 【0008】

本発明により提供されるペプチドの代表例を次に示す。

式(4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 4)、

式(5): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 5)、

式(6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号: 6)、

式(7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 7)、

式(8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (配列番号: 8) および

式(9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (配列番号: 9)。

## [0008]

The representative example of the peptide which this invention provides is shown next.

Formula (4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (sequence number: 4), formula (5): Ala Ala Pro Cys Cys Val

Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (sequence number: 5), formula (6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp

Leu Glu (sequence number: 6), formula (7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (sequence number: 7), formula

(8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (sequence number: 8)

And formula (9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (sequence number: 9).

## 【0009】

## [0009]

本発明のペプチドの塩は生理学的に許容される塩であり、その塩としては、例えば、塩酸、硫酸、磷酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、オレイン酸、パルミチン酸などの酸との塩；ナトリウム、カリウム、カルシウム、アルミニウムなどのアルカリ金属またはアルカリ土類金属の水酸化物または炭酸塩との塩；トリエチルアミン、ベンジルアミン、ジエタノールアミン、*t*-ブチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、アルギニンなどとの塩などが挙げられる。

**【0010】**

本発明のペプチドは、ペプチドの合成において通常用いられる方法、例えば固相合成法または液相合成法によって調製されるが、固相合成法が操作上簡便である（例えば、日本生化学会編「続生化学実験講座 2 タンパク質の化学（下）」、第 641-694 頁（昭和 62 年 5 月 20 日 株式会社東京化学同人発行）参照）。

**【0011】**

本発明のペプチドの固相合成法による調製は、例えば、スチレンージビニルベンゼン共重合体などの反応溶媒に不溶性である

The salt of the peptide of this invention is a salt which it accepts physiologically.

As its salt, it is a salt with acids, such as the hydrochloric acid, a sulfuric acid, a phosphoric acid, lactic acid, tartaric acid, a maleic acid, a fumaric acid, an oxalic acid, malic acid, a citric acid, an oleic acid, and a palmitic acid, for example.;

The hydroxide of alkali metals, such as sodium, potassium, calcium, and aluminium, or alkaline-earth metal, or salt with the carbonate; A salt with a triethylamine, a benzylamine, a diethanolamine, a *tert* butylamine, a dicyclohexylamine, the arginine, etc. is mentioned.

**[0010]**

The peptide of this invention is prepared by the procedure usually used in a synthesis of a peptide, for example, a solid-phase synthesis method, and the liquid-phase synthesis method. However, a solid-phase synthesis method simply on operation comes out, and there is (for example, refer to the Japanese Biochemical Society edition "chemistry (below) of the sequal and biochemistry experiment seminar 2 protein", and Page 641-694 (May 20, Showa 62 K.K. Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. issue)).

**[0011]**

The manufacture by the solid-phase synthesis method of the peptide of this invention is combined with a polymer insoluble in reaction solvent, such as for example, a



重合体に目的とするペプチドのC末端に対応するアミノ酸をそれが有する $\alpha$ -COOH基を介して結合させ、次いで該アミノ酸に目的とするペプチドのN末端の方向に向かって、対応するアミノ酸またはペプチド断片を該アミノ酸またはペプチド断片が有する $\alpha$ -COOH基以外の $\alpha$ -アミノ基などの官能基を保護したうえで縮合させて結合させる操作と、該結合したアミノ酸またはペプチド断片における $\alpha$ -アミノ基などのペプチド結合を形成するアミノ基が有する保護基を除去する操作とを順次繰り返すことによってペプチド鎖を伸長させ、目的とするペプチドに対応するペプチド鎖を形成し、次いで該ペプチド鎖を重合体から脱離させ、かつ保護されている官能基から保護基を除去することにより目的とするペプチドを得、次いでこれを精製することによって実施される。ここで、ペプチド鎖の重合体からの脱離および保護基の除去は、フッ化水素を用いて同時に行うのが副反応を抑制する観点から好ましい。また、得られたペプチドの精製は逆相液体クロマトグラフィーで行うのが効果的である。

**【0012】**

また、本発明のペプチドの塩は、

styrene-divinylbenzene copolymer, through the (alpha)-COOH group on which it has an amino acid corresponding to the C terminal of the peptide made into the objective.

Subsequently, the operation which it is made to condense after protecting functional groups, such as (alpha)- amino groups other than the (alpha)-COOH group on which this amino acid or a peptide fragment has the amino acid or peptide fragment which goes and corresponds to this amino acid in the direction of N terminal of the peptide made into the objective, and is combined, a peptide chain is expanded by repeating in order operation of removing the protecting group which the amino group which forms a peptide bond of the (alpha)- amino group in this united amino acid or united peptide fragment etc. has.

The peptide chain corresponding to the target peptide is formed, subsequently, this peptide chain is desorbed from a polymer.

And the target peptide is obtained by removing a protecting group from the functional group protected, subsequently, it implements by purifying this.

Here, it is desirable to perform simultaneously elimination of the desorption and the protecting group from the polymer of a peptide chain using hydrogen fluoride from a viewpoint which suppresses a side reaction.

Moreover, it is effective to perform purification of the obtained peptide by the reversed phase liquid chromatography.

**[0012]**

Moreover, the salt of the peptide of this

通常の塩生成反応を利用することにより調製される。

invention is prepared by utilizing normal salt generation reaction.

**【0013】**

後述の試験例から明らかなとおり、本発明のペプチドおよびその塩（以下、これらをペプチド類と略称する）は、 $TGF-\beta$ 様活性を有し、かつ毒性試験において低毒性であることが確認されている。

**[0013]**

The peptide of this invention and its salt (these are hereafter called peptides roughly) have a  $TGF-(\beta)$  like activity a passage clear from the below-mentioned EXPERIMENT, and the low\_toxic thing is confirmed in the toxic examination.

**【0014】**

以上の結果から、本発明のペプチド類は骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの治療に有用である。また、本発明のペプチド類は、臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制する。

**[0014]**

The peptides of the above result to this invention are useful for the treatment of fracture, a wound, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, multiple sclerosis, etc. Moreover, the peptides of this invention suppress the rejection after an organ transplant effectively.

**【0015】**

本発明のペプチド類は、骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの患者に投与することにより、上記罹患者の症状を軽減することができる。

**[0015]**

The peptides of this invention can lighten the above-mentioned disease person's symptom by administering to patients, such as fracture, a wound, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, and multiple sclerosis.

**【0016】**

ペプチド類の有効な活性発現のための投与量は、疾病、患者の重篤度、薬物に対する忍容性などにより異なるが、通常成人1日当たり、 $0.01 \mu g/kg$ ～

**[0016]**

The dosage for an effective active expression of peptides changes with the illness, a patient's seriousness, tolerances with respect to a medicine, etc.

However, they are normal adult 1 sunny and

2 g/kg であり、好ましくは 0.01 microgram/kg - 2 g/kg.  
0.01  $\mu$ g/kg ~ 200 mg/kg Preferably it is 0.01 microgram(s)/kg - 200  
/kg である。 mg/kg.

**【0017】**

投与形態としてはペプチド類を 5%ブドウ糖液や生理食塩水などの生理学的に許容し得る溶液に溶解させて得られる溶液が好ましく、また該溶液は薬理学的に許容される種々の添加剤を含んでいてもよい。

**[0017]**

The solution obtained by dissolving peptides in solutions which can accept physiologically, such as 5-% glucose liquid and physiological saline, as an administration form is desirable, moreover, this solution may contain the various additive agent which it accepts pharmacologically.

**【0018】**

投与方法としては静脈投与、皮下投与、腹腔投与、関節内投与、経皮投与などが挙げられ、さらにペプチド類をカプセル化またはリポソーム化することにより経口投与も可能である。

**[0018]**

As the administration procedure, an intravenous administration, a subcutaneous administration, an abdominal-cavity administration, the administration in a joint, a percutaneous administration, etc. are mentioned, oral administration can also further do peptides capsulation or by liposome-izing.

**【0019】****[0019]****【実施例】**

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。なお、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

**[EXAMPLES]**

Hereafter, an Example demonstrates this invention concretely. In addition, this invention is not limited by these Examples.

**【0020】****実施例 1**

式(4): Asn Pro Gly Ala Ser Ala  
Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln  
Ala LeuGlu (配列番号: 4) で

**[0020]****Example 1**

Formula (4): The peptide shown by Asn Pro Gly  
Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala  
LeuGlu (sequence number: 4) was

示されるペプチドをペプチド自動合成装置を用いて固相合成法により合成した。すなわち、4-〔N-(t-ブトキシカルボニル)-γ-ベンジル-L-グルタミルオキシメチル〕-フェニルアセトアミドメチル基を0.70ミリモル/g(樹脂)の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比:99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMグルタミン酸、t-Boc-L-Glu(OBzl)〕0.1ミリモルを用い、ペプチドのN端に向かって順次アミノ酸を結合させた。結合反応において、アミノ酸として、米国アプライド・バイオシステムズ社製のN↑α-(t-ブトキシカルボニル)-L-グルタミン〔t-Boc グルタミン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-ロイシン〔t-Boc ロイシン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-プロリン〔t-Boc プロリン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-グリシン〔t-Boc グリシン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-アスパラギン〔t-Boc アスパラギン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-O-ベンジル-L-セリン〔t-Boc セリン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-S-(p

compounded by the solid-phase synthesis method using the peptide automatic-synthesis apparatus.

That is, 0.1 millimoles of the grain-shape resin (USA Applied Biosystems make, PAM glutamic acid, t-Boc-L-Glu (OBzl)) which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which it has at a ratio of 0.70 millimoles (resin)/g are used, 4-(N-(t-butoxycarbonyl)-(gamma)-benzyl-L-glutamyl oxy methyl)- The amino acid was combined for the phenyl acetamide methyl group in order toward N edge of a peptide.

For joint reaction, as an amino acid, the N↑(alpha)-(t-butoxycarbonyl)-L- glutamine by USA Applied Biosystems (t-Boc glutamine), a N-(t-butoxycarbonyl)-L- leucine (t-Boc leucine), a N-(t-butoxycarbonyl)-L- proline (t-Boc proline), a N-(t-butoxycarbonyl)-L- glycine (t-Boc glycine), N-(t-butoxycarbonyl)-L- asparagine (t-Boc asparagine), N-(t-butoxycarbonyl)-O-benzyl- L- serine (t-Boc serine), the N-(t-butoxycarbonyl)-S-(p- methoxy benzyl)-L- cystein (t-Boc cystein), the N-(t-butoxycarbonyl)-L- valine (t-Boc valine), and 1 millimole (t-Boc alanine) of N-(t-butoxycarbonyl)-L- alanines were used, respectively.

ーメトキシベンジル) -L-シ  
 ス테인 [t-Boc システイン]、  
 N-(t-ブトキシカルボニル)  
 -L-バリン [t-Boc バリン]、  
 N-(t-ブトキシカルボニル)  
 -L-アラニン [t-Boc アラニ  
 ン] をそれぞれ1ミリモル用い  
 た。

#### 【0021】

得られたペプチドについて株式  
 会社ペプチド研究所製のHF反  
 応装置I型を用いて脱保護と固  
 相からの脱離を行った。粗生成  
 物をミリポア・ウォーターズ社  
 製分取用高速液体クロマトグラ  
 フ〔カラム：デルタパックC1  
 8 47×300mm プレップ  
 パック1000加圧モジュール  
 付〕で精製した。得られた精製  
 ペプチドを島津製作所株式会  
 社製LC6A分析用高速液体クロ  
 マトグラフ〔カラム：東ソー株  
 式会社製TSK gel ODS  
 -80TM CTR、移動相：  
 トリフルオロ酢酸を0.05容  
 量%含有するアセトニトリルと  
 水の混合溶媒（アセトニトリル  
 濃度を30分間で5容量%から  
 50容量%に変化させた）〕に付  
 したところ、18.8minに単一  
 のピークが示された。FAB法  
 マススペクトルにより求めた精  
 製ペプチドの分子量は1527  
 であった（理論値：1527.  
 72）。

#### 【0021】

The desorption from de-protection and a  
 solid-phase was performed using the HF  
 reactor I type by Peptide Institute. Inc., K.K.,  
 about the obtained peptide.

The crude product was purified by the  
 high-speed liquid chromatograph for the  
 aliquoting made from the Millipore \* Waters Inc.  
 (column: with a delta pack C18 47\*300 mm prep  
 pack 1000 pressurization module).

About the obtained purification peptide, it is a  
 high-speed liquid chromatograph for the LC6AA  
 analysis by Shimadzu K.K. (column : attaching  
 to Tosoh Corp. TSKgel ODS-80TM CTR CTR).

Mobile phase: The single peak was shown by  
 18.8min when the trifluoroacetic acid was  
 attached to the mixed solvent (acetonitrile  
 density was changed from 5 volume % to 50  
 volume % in 30 minutes) of the acetonitrile  
 which contains 0.05 volume %, and water.

The molecular weight of the purification peptide  
 for which it required by the FAB method mass  
 spectrum was 1527 (theoretical value:  
 1527.72).

**【 0 0 2 2 】**

実施例 2 ～ 6 および比較例 1

式 (5): Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro IleVal (配列番号: 5) で示されるペプチド (実施例 2)、式 (6): Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号: 6) で示されるペプチド (実施例 3)、式 (7): Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro GlnAsp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 7) で示されるペプチド (実施例 4)、式 (8): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (配列番号: 8) で示されるペプチド (実施例 5)、式 (9): Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln AspLeu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (配列番号: 9) で示されるペプチド (実施例 6)、および式 (10): Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser (配列番号: 10) で示されるペプチド (比較例 1) を実施例 1 と同様の方法により合成した。

**[0022]**

Example 2-6 and Comparative Example 1

Formula (5): Peptide (Example 2) shown by Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro IleVal (sequence number: 5), formula (6): Peptide (Example 3) shown by Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (sequence number: 6), formula (7): Peptide (Example 4) shown by Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro GlnAsp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (sequence number: 7), formula (8): Peptide (Example 5) shown by Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (sequence number: 8), formula (9): Peptide (Example 6) shown by Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln AspLeu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (sequence number: 9), and formula (10): Peptide (Comparative Example 1) shown by Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser was compounded by the procedure similar to Example 1 (sequence number: 10).

**【 0 0 2 3 】**

実施例 2 および実施例 4 では 4  
 - [N- (t-ブトキシカルボ  
 ニル) -L-バリルオキシメチ

**[0023]**

In Example 2 and Example 4, it is 4.  
 -(N-(t-butoxycarbonyl)-L- valyl oxy methyl)- 0.1  
 millimoles (USA Applied Biosystems make,

ル] -フェニルアセトアミドメチル基を0.68ミリモル/g (樹脂)の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体 [スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99対1] からなる粒状樹脂 [米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMバリン、t-Boc-L-Val] 0.1ミリモルを用い、実施例3では4-[N-(t-ブトキシカルボニル)-γ-ベンジルーL-グルタミルオキシメチル]-フェニルアセトアミドメチル基を0.70ミリモル/g (樹脂)の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体 [スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99対1] からなる粒状樹脂 [米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMグルタミン酸、t-Boc-L-Glu(OBzl)] 0.1ミリモルを用い、実施例5及び実施例6では4-[N-(t-ブトキシカルボニル)-L-ロイシルオキシメチル]-フェニルアセトアミドメチル基を0.68ミリモル/g (樹脂)の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体 [スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99対1] からなる粒状樹脂 [米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMロイシン、t-Boc-L-Leu] 0.1ミリモルを用い、比較例1では4-

PAM valine, t-Boc-L-Val) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group at a ratio of 0.68 millimoles (resin)/g are used, in Example 3, it is 4. -(N-(t-butoxycarbonyl)-(gamma)- benzyl- L- glutamyl oxy methyl)- 0.1 millimoles (USA Applied Biosystems make, PAM glutamic acid, t-Boc-L-Glu (OBzl)) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group at a ratio of 0.70 millimoles (resin)/g are used, in Example 5 and Example 6, it is 4. -(N-(t-butoxycarbonyl)-L-leucyl oxy methyl)- 0.1 millimoles (USA Applied Biosystems make, a PAM leucine, t-Boc-L-Leu) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group at a ratio of 0.68 millimoles (resin)/g are used, in Comparative Example 1, it is 4. -(N-(t-butoxycarbonyl)-O- benzyl- L- seril oxy methyl)- 0.1 millimoles (USA Applied Biosystems make, PAM serine, t-Boc-L-Ser (Bzl)) of grain-shape resin which consists of a styrene-divinylbenzene copolymer (composition molar ratio of styrene and divinylbenzene: 99 to 1) which has a phenyl acetamide methyl group at a ratio of 0.72 millimoles (resin)/g were used.

〔N- (t-ブトキシカルボニル) -O-ベンジル-L-セリルオキシメチル〕 -フェニルアセトアミドメチル基を0.72ミリモル/g (樹脂) の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99対1〕 からの粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMセリン、t-Boc-L-Ser(Bzl)〕 0.1ミリモルを用いた。

## 【0024】

また、アミノ酸としては、実施例1で用いたものに加えて米国アプライド・バイオシステムズ社製のN- (t-ブトキシカルボニル) -O- (2-ブロモベンジルオキシカルボニル) -L-チロシン〔t-Boc チロシン〕、N- (t-ブトキシカルボニル) -L-イソロイシン〔t-Boc イソロイシン〕、N- (t-ブトキシカルボニル) -γ-ベンジル-L-グルタミン酸〔t-Boc グルタミン酸〕、N- (t-ブトキシカルボニル) -β-ベンジル-L-アスパラギン酸〔t-Boc アスパラギン酸〕、N↑α- (t-ブトキシカルボニル) -NInd-ホルミル-L-トリプトファン〔t-Boc トリプトファン〕を用いた。

## [0024]

As an amino acid, it adds to what was used in Example 1. Moreover, the N-(t-butoxycarbonyl)-O-(2-bromobenzyloxycarbonyl)-L-tyrosine by USA Applied Biosystems (t-Boc tyrosine), the N-(t-butoxycarbonyl)-L-isoleucine (t-Boc isoleucine), n-(t-butoxycarbonyl)-(gamma)-benzyl-L-glutamic acid (t-Boc glutamic acid), N-(t-butoxycarbonyl)-(beta)-benzyl-L-aspartic acid (t-Boc aspartic acid), n↑(alpha)-(t-butoxycarbonyl)-NInd-formyl-L-tryptophan (t-Boc tryptophan) were used.



【0025】

得られたそれぞれのペプチドについて実施例1におけると同様にして脱保護と固相からの脱離を行い、粗生成物を精製した。それぞれの精製ペプチドについて、分析用高速液体クロマトグラフにおける溶出時間およびFAB法マスペクトルによる分子量測定結果を第1表にまとめて示す。

[0025]

In Example 1, the desorption from de-protection and a solid-phase was similarly performed about each obtained peptide, and the crude product was purified.

About each purification peptide, the elution time in the high-speed liquid chromatograph for an analysis and the determination-of-molecular-weight result by the FAB method mass spectrum are summarized in Table 1, and are shown.

【0026】

[0026]

【表1】

[TABLE 1]

第 1 表

| 実施例<br>または<br>比較例 | 溶出時間<br>(min) | 精製ペプチド |      | (理論値)   |
|-------------------|---------------|--------|------|---------|
|                   |               | 式番号    | 分子量  |         |
| 実施例2              | 23.9          | (5)    | 1620 | 1620.97 |
| 実施例3              | 18.0          | (6)    | 1658 | 1659.79 |
| 実施例4              | 23.8          | (7)    | 1680 | 1680.98 |
| 実施例5              | 25.5          | (8)    | 2112 | 2115.38 |
| 実施例6              | 25.0          | (9)    | 2111 | 2111.39 |
| 比較例1              | 23.4          | (10)   | 1631 | 1629.78 |

First Table

Example or Comparative Example; Elution time; Purification Peptide (Formula number; Molecular weight); (Theoretical value)

## Example 2

...

## Comparative Example 1

## 【0027】

## 試験例 1

コンカナバリンA刺激マウス脾臓細胞の増殖抑制試験

BALB/cマウス脾臓細胞を、コンカナバリンA:  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、2-メルカプトエタノール:  $50 \mu\text{M}$ 、牛胎児血清: 13%の割合でそれぞれ含有するRPMI-1640培地に分散し、5000個/ウエルの割合で96ウエルプレートに分注し、7%CO<sub>2</sub>存在下37℃で7日間培養した。培養後プロピディウムアイオダイドで生細胞のDNAを標識し、蛍光強度を測定することにより生細胞数をカウントした。ペプチドは $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、TGF- $\beta$ は1 ng/mlの濃度になるようにそれぞれコンカナバリンA刺激直前に添加した。コンカナバリンAを加えないウエルに対するコンカナバリンAのみを加えたウエルの生細胞数の増加を1として、ペプチドまたはTGF- $\beta$ を加えた時の生細胞数の減少を抑制率として表した。結果を第2表に示す。

## [0027]

## Experiment 1

The growth-inhibition examination of the A-concanavalin-A irritation mouse spleen cell

The BALB/c-mouse spleen cell is dispersed to RPMI-1640 medium which contains at A-concanavalin-A:3 microgram/ml,

2-mercaptoethanol:50 micronM, and a foetal-bovine-serum:13% ratio, respectively, it dispenses on 96 well plate at a ratio of 5000 piece / well, 7% CO<sub>2</sub> -- it cultivated for seven days at 37 degrees C in presence.

DNA of a living cell is labeled with propidium iodide after cultivating, the living cell number was counted by measuring a fluorescence intensity.

The peptide added 100 microgram(s)/ml and TGF- (beta-) just before the A-concanavalin-A irritation, respectively so that it might become the density of 1 ng/ml.

The increase in the living cell number of the well which added only the A concanavalin A with respect to the well which does not add the A concanavalin A is set to 1, the reduction of the living cell number when adding a peptide or TGF- (beta-) was expressed as a suppression rate.

A result is shown in Table 2.

## 【0028】

## [0028]

【表 2】

[TABLE 2]

第 2 表

| 実施例または<br>比較例 | ペ プ チ ド          | 抑制率 (%) |
|---------------|------------------|---------|
| —             | T G F - $\beta$  | 8 5     |
| 実施例 1         | 式 (4) で表されるペプチド  | 6 0     |
| 実施例 2         | 式 (5) で表されるペプチド  | 7 0     |
| 実施例 3         | 式 (6) で表されるペプチド  | 6 5     |
| 実施例 4         | 式 (7) で表されるペプチド  | 7 3     |
| 実施例 5         | 式 (8) で表されるペプチド  | 7 0     |
| 実施例 6         | 式 (9) で表されるペプチド  | 7 2     |
| 比較例 1         | 式 (10) で表されるペプチド | 2       |

Second Table

Example or Comparative Example; Peptide; Suppression rate

Example 1; Peptide expressed with formula (4)

...

Comparative Example 1; ...

【0029】

第2表のとおり、TGF- $\beta$ の抑制率が85%であるのに対し、実施例1～実施例6で得られたペプチドの抑制率は60%～73%であり、本発明のペプ

[0029]

As opposed to the suppression rate of TGF-(beta-) being 85 % as Table 2, the suppression rate of the peptide obtained in Example 1-Example 6 is 60 % - 73 %.

It is clear that the peptide of this invention

チドが TGF- $\beta$  様の活性を示すことは明らかである。 shows TGF-(beta) -like activity.

## 【0030】

## 試験例 2

軟寒天中のコロニー形成試験  
 2.5 ng/ml の EGF、10% の牛胎児血清及び 0.5% の寒天を含むイーグルの MEM 培地に NRK-49F 細胞を 1000 個 / シャーレの割合で直径 10 cm のシャーレに撒き、7% CO<sub>2</sub> 存在下 37℃ で 7 日間培養した。ニュートラルレッドで生細胞を染色し、コロニー 100 個あたりの 70  $\mu$ m 以上の直径を有するコロニーの割合を求めた。その結果、実施例 1 で得られたペプチドを 300  $\mu$ g / ml の濃度で添加したときに平均 58% のコロニーが形成され、何も添加しないコントロールの平均 33% と比較して有意にコロニー形成が促進された。

## [0030]

## Experiment 2

The colony formation examination in soft agar NRK-49F cell is scattered at a ratio of 1000 piece / Petri dish at a Petri dish with a diameter of 10 cm to the MEM medium of the eagle containing 2.5-ng/ml EGF, 10% of foetal bovine serum, and 0.5% of agar, in presence of 7% CO<sub>2</sub> ↓ 2, it cultivated for seven days at 37 degrees C.

A living cell is colored by the neutral red, the ratio of a colony of having the diameter of 70 micrometer or more per 100 colonies was searched for.

Consequently, when the peptide obtained in Example 1 is added by 300 microgram(s)/ml density, an average of 58% of colony is formed, compared with an average of 33% of the control which nothing adds, colony formation was promoted significantly.

## 【0031】

## 【発明の効果】

本発明により提供されるペプチド類は、骨折、創傷、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病などの治療に有効であり、また臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制することができる。

## [0031]

## [ADVANTAGE of the Invention]

The peptides which this invention provides are effective in the treatment of fracture, a wound, multiple sclerosis, a rheumatic arthritis, osteoarthritis, osteoporosis, a periodontal disease, etc.

Moreover, the rejection after an organ transplant can be suppressed effectively.

【 0 0 3 2 】

[0032]

## 【配列表】

配列番号： 1  
配列の長さ： 1 1  
配列の型：アミノ酸  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：ペプチド

## [SEQUENCE TABLE]

Sequence number: 1  
Sequence length: 11  
Sequence type: Amino acid  
Topology: Linear  
Type of sequence: Peptide

## 配列

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu  
1                      5                      10

Sequence

【 0 0 3 3 】

[0033]

配列番号： 2  
配列の長さ： 1 1  
配列の型：アミノ酸  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：ペプチド

Sequence number: 2  
Sequence length: 11  
Sequence type: Amino acid  
Topology: Linear  
Type of sequence: Peptide

## 配列

Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu  
1                      5                      10

Sequence

【 0 0 3 4 】

[0034]

配列番号： 3  
配列の長さ： 1 1  
配列の型：アミノ酸  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：ペプチド

Sequence number: 3  
Sequence length: 11  
Sequence type: Amino acid  
Topology: Linear  
Type of sequence: Peptide

**配列**

Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu

1 5 10

## Sequence

**【 0 0 3 5 】**

配列番号 : 4

配列の長さ : 1 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

## 配列

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro

Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu

Glu

1 5 15  
10 15**[0035]**

Sequence number: 4

Sequence length: 16

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

Type of sequence: Peptide

## Sequence

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val

Pro Gln Ala Leu Glu

1 5 10  
15**【 0 0 3 6 】**

配列番号 : 5

配列の長さ : 1 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

## 配列

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile

Val

1 5 15  
10 15**[0036]**

Sequence number: 5

Sequence length: 16

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

Type of sequence: Peptide

## Sequence

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu

Pro Leu Pro Ile Val

1 5 10  
15**【 0 0 3 7 】**

配列番号 : 6

配列の長さ : 1 6

**[0037]**

Sequence number: 6

Sequence length: 16

配列の型：アミノ酸  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：ペプチド  
 配列

Sequence type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Type of sequence: Peptide  
 Sequence

Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val  
 Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu  
 Glu 1 5 10  
 1 5 15  
 10 15

**【0038】**

配列番号：7  
 配列の長さ：16  
 配列の型：アミノ酸  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：ペプチド  
 配列

**[0038]**

Sequence number: 7  
 Sequence length: 16  
 Sequence type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Type of sequence: Peptide  
 Sequence

Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu  
 Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val  
 Ile Val 1 5 10  
 1 5 15  
 10 15

**【0039】**

配列番号：8  
 配列の長さ：21  
 配列の型：アミノ酸  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：ペプチド  
 配列

**[0039]**

Sequence number: 8  
 Sequence length: 21  
 Sequence type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Type of sequence: Peptide  
 Sequence

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val  
 Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Ser Gln Asp Leu Glu  
 Glu 1 5 10  
 1 5 15  
 10 15  
 Pro Leu Thr Ile Leu  
 Pro Leu Thr Ile Leu 20

20

**【0040】**

配列番号：9

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro

Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu

Glu

1

10

Pro Leu Pro Ile Leu

20

**[0040]**

Sequence number: 9

Sequence length: 21

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

Type of sequence: Peptide

Sequence

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val

Ser Gln Asp Leu Glu

1

5

10

5 15

Pro Leu Pro Ile Leu

20

**【0041】**

配列番号：10

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser

Leu Asp Thr Gln Tyr Ser

1

5 1

5

10

10

**[0041]**

Sequence number: 10

Sequence length: 14

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

Type of sequence: Peptide

Sequence

Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln

Tyr Ser





## DERWENT TERMS AND CONDITIONS

*Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)